

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI

---

PROF. DR. DOC. L. ABABEI

CONF. DR. M. TRANDAFIRESCU

# BIOCHIMIE

(PARTEA II)

RESPIRAȚIA CELULARĂ SI  
CICLUL KREBS

1974

*Dr. Trandafirescu*

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI

Prof.Dr.Doc.L.Ababei

Conf.Dr.M.Trandafirescu

**BIOCHIMIE**  
( partea II )

Respirația celulară  
și  
Ciclul Krebs



Comme c'est curieux, comme  
c'est bizarre, et quelle  
coïncidence!

E. Ionesco

Procesului de respirație celulară care generează cantitatea principală de energie în celula vie cu regim de viață aerob, autorii îi dedică paginile ce urmează, încercând să contribuie la ușurarea efortului de înțelegere al acestui proces mult studiat dar complicat și încă insuficient cunoscut.

Materialul se adresează în primul rând studenților mediciști și farmaciști.

Autorii vor fi recunoscători aceluia care vor aduce completări și vor face observații cu privire la cuprinsul lucrării.

Aducem mulțumiri și pe această cale tov. Ing. chimist Croitoru Irina pentru ajutorul acordat la redactare.

L. Ababei

Maria Trandafirescu

## INTRODUCERE

Toate organismele aerobe au proprietatea de respirație celulară, cu alte cuvinte, de a oxida moleculele substanțelor nutritive cu ajutorul oxigenului molecular. Semnificația biologică a respirației celulare o depășește cu mult pe aceea a respirației pulmonare. Aceasta din urmă ca și funcția de transportor de oxigen a hemoglobinei sînt numai procese auxiliare ale respirației celulare.

Respirația celulară pune la dispoziția celulei energie sub formă de adenzintrifosfat (ATP) care se formează din adenzindifosfat (ADP) și fosfat anorganic ( $P_a$ ). Această reacție este conectată funcțional la procesul de respirație celulară și poartă denumirea de fosforilare oxidativă (P/O) controlînd consumul de oxigen cu componentele fosforilării oxidative (ATP, ADP și  $P_a$ ). În majoritatea celulelor, cea mai mare parte a sintezei de ATP se face în procesul de fosforilare oxidativă, ATP-ul fiind sursa de energie universală pentru o varietate mare de procese celulare ca: reacții sintetice, contracție musculară, activitate electrică, procese de transport, etc. Ca rezultat al acestor procese



consumatoare de energie, ATP este hidrolizat în ADP și  $P_a$  care apoi poate fi din nou convertit în ATP prin fosforilarea oxidativă, închizînd astfel ciclul metabolismului general energetic.

Materia vie este într-o stare permanentă progresivă de schimbări chimice și fizice. Caracteristic pentru materia vie este procesul de creștere și de îmbătrînire, proces care nu începe la o etapă anumită a istoriei procesului de viață, ci o expresie a faptului că încă din momentul apariției primelor forme de viață, survin și schimbări fizice și chimice în structura materiei vii. Aceste schimbări implică un continuu flux de energie. Contribuția pe care o au procesele de respirație celulară în această direcție, este de două naturi :

- furnizează compuși intermediari, din care poate fi constituită materia vie,

- canalizează fluxul energetic pe căile metabolice implicate în sinteza materiei vii.

Prin termenul de fosforilare oxidativă, se înțelege un proces de fosforilare cuplat cu un proces de oxidare. În celula vie întâlnim procesul de fosforilare a ADP de către  $P_a$ . Formal am putea reda reacția de fosforilare oxidativă după ecuația :



care reprezintă suma a două reacții esențial ireversibile și anume :





Pentru ca fosforilarea ADP să aibă loc, oxidarea substratului  $AH_2$  (dehidrogenarea acestuia) trebuie să elibereze suficientă energie pentru a permite formarea de ATP.

Calea glicolitică a metabolismului energetic este activă în absența oxigenului și a fost denumită de L.Pasteur, cu mulți ani în urmă "La vie sans l'air." Glicoliza poate fi reconstruită în soluție, cu enzime purificate.

Procesele de viață aerobe, folosesc un mijloc de conservare a energiei - fosforilarea oxidativă - care nu poate fi reconstruită în soluții, datorită faptului că necesită o organizare structurală a enzimelor. Această structură este materializată în mitocondrii denumite și centrale energetice ale celulei.

Celula vie este o mașină chimică, izotermă, care transformă energia pe care o absoarbe din mediul înconjurător, în energie chimică pe care o folosește în reacțiile chimice implicate în procesele de biosinteză a componentelor celulare, în activitatea osmotică necesară pentru transportul diferitelor materiale în celulă sau pentru activitatea mecanică a contracției și locomotiei.<sup>(1)</sup> În prezent, inginerii tehnologi, se străduiesc să construiască astfel de mașini care să poată converti



energia chimică izotermică în energie mecanică, adică acel tip de conversie de energie care obișnuit se întâlnește în activitatea celulară. Aceasta este și una din sarcinile principale ale bionicii, știință care își are începuturile în urmă cu 20 de ani, și care își propune un program grandios de a copia în tehnică sisteme și funcții ale materiei vii, ale celulei, ale organismelor.

Dacă în urmă cu câțiva ani, mitocondria prin activitatea respiratorie era considerată centrala energetică a celulei, studiile recente ale structurii și funcției acestei substructuri celulare, au complicat mult aceste considerații. Capacitatea mitocondriilor de a se autoreplica, prezența în acestea a unor forme specifice de ADN, pun probleme noi și importante pentru genetică și diferențierea celulară, dependente de asemenea de activitatea mitocondrială.

Dacă în urmă cu câțiva ani, se putea vorbi despre o compartimentare celulară în care intra și un compartiment mitocondrial,<sup>(2)</sup> astăzi se vorbește despre o compartimentare a reacțiilor enzimatice în interiorul mitocondriei, despre rolul structurilor membranare în mecanismul de fosforilare, despre rolul mitocondriei în transportul de ioni, etc.



# Date în legătură cu structura mitocondrială.

Esențial în structura mitocondriilor sînt

dubla membrană și cristale caracteristice.

Încă din 1953, Palade<sup>(3)</sup> a arătat că numărul cristelor

mitocondriale și conformația acestora, variază conside-

rabil de la un tip de mitocondrie la altul. Deci elemen-

te comune pentru toate mitocondriile sînt: o membrană

externă, o membrană internă, cristale și matricea mito-

condrială sau lichidul mitocondrial, granulele dense și

ADN mitocondrial.

Prin matrice (lichid mitocondrial) se înțelege spațiul

dintre cristale și membrană internă, care mai poartă denu-

miră și de "compartment intern mitocondrial".

Spațiul dintre membrana internă și membrana externă, poar-

tă denumirea de "compartment extern mitocondrial".

Cristele au structură bimbrenare și spațiul dintre

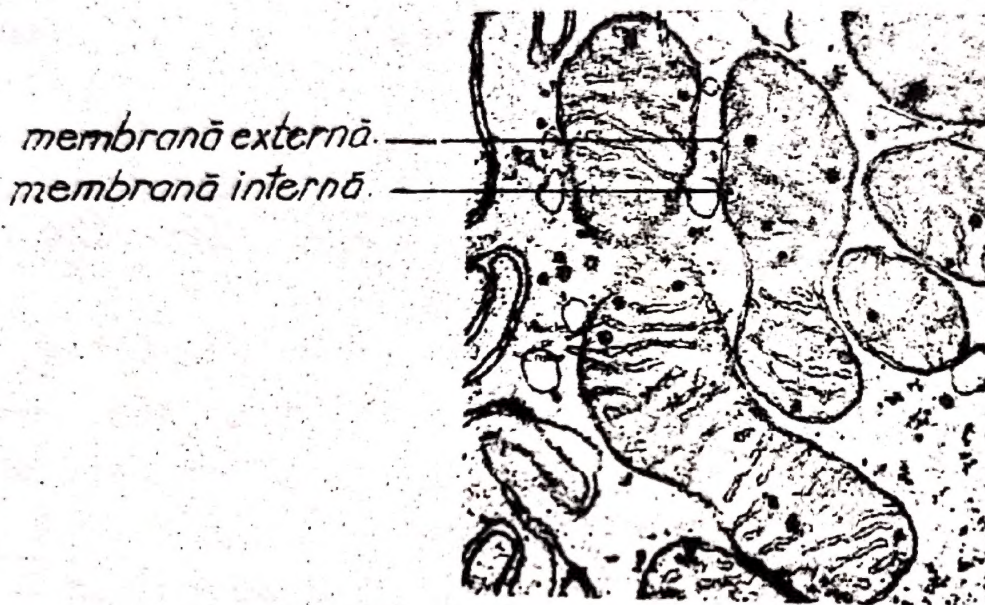
aceste două membrane este în legătură cu compartimentul

extern mitocondrial.

În figura care urmează sînt redată mitocondrii dintr-o

celulă acințată de pancreas, (după Palade mărire x 70000)

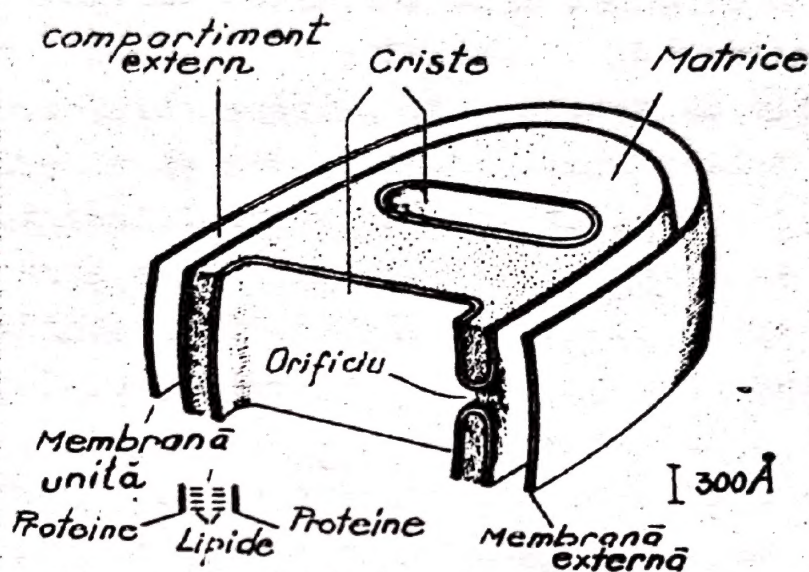




În timpul umflării ( swelling ) mitocondriei, acest spațiu ca și compartimentul exterior mitocondrial sînt mult mărite.

Whittaker<sup>(4)</sup> ilustrează o secțiune transversală prin mitocondrie din care se văd relațiile dintre diferite compartimente mitocondriale.





Mitocondrii pot fi găsite în citoplasma tuturor celulelor aerobe, eucariotice. Numărul mitocondriilor deși relativ constant pentru anumite tipuri de celule, poate varia în funcție de vîrstă sau activitate funcțională.

Celula hepatică de șobolan conține în jur de 1000 mitocondrii iar spermatozoidul circa 20-30 mitocondrii. Pentru mitocondriile de ficat, cele mai studiate, cercetările electron microscopice au arătat o lungime de circa  $2\mu$  și o lățime de circa  $1\mu$ . În bacterii dimensiunile mitocondriilor sînt aproximativ aceleași.

Forma mitocondriilor variază după tipul de



celulă. Este sferică la celulele de drojdie, rotundă la celulele hepatice, cilindrică la celulele rinichiului, filiformă la fibroblaști. S-au descris mitocondrii și în formă de lespede și stelate.

În funcție de starea metabolică a celulei, mitocondriile își pot schimba cu ușurință forma și uneori pot agrega capăt la capăt formând structuri filamentoase. În general ele sînt localizate în apropierea structurilor ce consumă ATP, produs al activității mitocondriale sau în apropierea unei surse de substrat de care depinde respirația mitocondrială.

În celula musculară cu activitate intensă ca aceea a mușchiului aripei de la insecte, mitocondriile sînt aranjate în lungul miofibrilei egal distanțate. În aceste fibre musculare de culoare roșie-datorită conținutului mare în mioglobină și citocromi-respirația servește ca sursă principală de energie pentru refosforilarea ADP-ului în procesul de fosforilare oxidativă mitocondrială.

Dacă mușchiul este stimulat la o activitate maximală, atît consumul de glucoză cît și cel de oxigen crește. Creșterea consumului de oxigen este rezultatul scindării ATP-ului în ADP în timpul contracției musculare, livrînd în acest mod ADP în calitate de acceptor de fosfat și astfel stimulînd atît transportul de electroni pentru care ADP-ul este factor limitant, cît și activitatea izocitric dehidrogenazei, pentru care ADP-ul este modulator pozitiv ca efector alosteric.

ATP-ul format în mitocondriile celulei musculare, trebuie să parcurgă o distanță extrem de scurtă pentru a ajunge la elementele contractile din miofibrilele consumatoare de ATP.

Problema genezei și înmulțirii mitocondriilor este foarte actuală. Astfel André<sup>(5)</sup> în 1962 consideră că : "Le problème difficile de l'origine des mitochondries a donné lieu à des débats passionnés, il est encore apremment discuté. Pendant longtemps, les partisans de la scissions mitochondriale se sont opposés aux partisans de la formation de novo. La scission a été maintes fois observée, ... mais on n'a pas démontré qu'elle corresponde à une augmentation du volume total du chondriome, c'est-à-dire à une vraie multiplication".

Brosemer<sup>(6)</sup> studiind dezvoltarea musculaturii aripilor la *Locusta migratoria*, ajunge la concluzia că, creșterea condriomului în acest caz se face prin creșterea mitocondriilor de bază, în sensul unei automultiplicări a materialului mitocondrial.

În mitocondrii, a fost pusă în evidență prezența ADN<sup>(7,8,9,10)</sup> și ARN<sup>(8,9,10,11)</sup>. De asemenea s-a izolat din mitocondrii și o ARN polimerază<sup>(10,11,12,13,14)</sup>. Aceste date arată că în aceste organele celulare semiautonome, există o reală capacitate de sinteză a ARN, asemănătoare celeia din nucleu. Fry<sup>(56)</sup> descrie o ADN-polimerază în mitocondriile de celule HeLa, dependentă de ADN. Aceasta diferă de ADN-polimeraza din aceleași celule, din nucleu și citoplasmă prin cinetică, greutate mo-



leculară și sensibilitate la inhibitori. ADN mitocondrial din celulele mamiferelor, este circular și apare în diferite forme moleculare<sup>(57,58,59,60)</sup>

Capacitatea mitocondrială de sinteză a ADN a fost demonstrată in vivo<sup>(61,62,63)</sup> și in vitro<sup>(64,65,66)</sup>. O ADN polimerază a fost izolată și caracterizată din mitocondriile de ficat<sup>(67,68,69)</sup>.

Wu<sup>(70)</sup> descriind o ARN-polimerază dependentă de ADN din mitocondrii de ovare de *Xenopus laevis* arată că enzima necesită pentru activitate prezența ionilor de  $Mg^{2+}$ , este insensibilă la  $Mn^{2+}$ , folosește ca substrat nucleozid trifosfați, este un monomer cu o greutate moleculară de 46000 și este puternic inhibată de KCl, NaCl, și  $(NH_4)_2SO_4$  în concentrații între 0,4 - 0,1 M. Polimerazele similare nucleare nu sunt inhibate de aceste săruri. Polimerazele nucleare sunt inhibate de alfa-amanitină, cele mitocondriale sunt insensibile.

ARN-polimeraza din mitocondriile de ficat de șobolan este sensibilă la rifampicină<sup>(71)</sup>.

În 1973 Kuroiwa<sup>(15)</sup> demonstrează prin studii electron microscopice, digestie enzimatică și autoradiografie electron microscopică prezența atât a ADN cât și ARN în porțiunea centrală a mitocondriei și descrie distribuția în aceste organele a ARN nou sintetizat.

Ojala și Attardi<sup>(16)</sup> arată că structurile polizomale din mitocondrii de celule HeLa conțin 2 pînă la 7 monomeri 60S. Existența în mitocondrii a ribozomilor 55-60S, care reprezintă locul de încorporare al amino-

acizilor in vitro și in vivo, cu caracteristicile necesare sintezei mitocondriale de proteine a fost descrisă și pentru celulele hepatice de șobolan<sup>(17,18)</sup>. De asemenea se arată că polizomii mitocondriali sînt rezistenți la tratamentul cu ARN-ază și cu EDTA. Aceste fapte demonstrează că polizomii mitocondriali se deosebesc de polizomii legați de reticulum endoplasmatic care sînt sensibili atît la tratamentul cu ARN-ază cît și cu EDTA.

Există date suficiente din experimente autoradiografice care arată că replicarea ADN-ului mitocondrial este independentă de replicarea ADN-ului nuclear<sup>(20,21,22,23,24)</sup>, ca și prezența în mitocondrii a unui aparat enzimatic pentru replicarea ADN mitocondrial.<sup>(25,26)</sup> Mattoccia<sup>(27)</sup> studiind replicarea ADN-ului mitocondrial în raport cu ciclul celular din celule HeLa, arată că replicarea ADN-ului mitocondrial are loc asincronic, deci autonomă față de celulă.

Linnane<sup>(28,29)</sup>, Thomas<sup>(30)</sup> și Coen<sup>(31)</sup> au demonstrat că genele rezistenței la antibiotice sînt localizate în ADN-ul mitocondrial. Gingold<sup>(32,33)</sup> și Rank<sup>(34)</sup> caracterizează gena rezistenței la eritromicină din ADN-ul mitocondrial.

Datele prezentate mai sus arată că mitocondriile au o capacitate reală pentru sinteză de proteine. În această direcție sînt utile de remarcat o serie de lucrări<sup>(35,36,37,38,39)</sup> în care este descrisă capacitatea de sinteză de proteine în mitocondriile celulelor din cortexul cerebral, puternic diferențiate.



După cum se știe, celulele neuronale ale creierului comunică între ele prin procese sinaptice. Terminațiile sinaptice la capătul lor periferic sfârșesc într-o umflătură sinaptică umplută cu vezicule sinaptice și mitocondrii<sup>(40)</sup>. Această zonă a celulei nervoase necesită cantități importante de proteină pentru a-și îndeplini funcțiile specializate. În timpul omogenizării cortexului cerebral, umflăturile sinaptice se rup, se separă de celulele din care provin și se adună într-un fel de organele foarte fragile din punct de vedere osmotic, denumite sinaptozomi de Whittaker.<sup>(41)</sup>

În ultimii ani, s-a studiat capacitatea de sinteză pentru proteine, a diferitelor fracțiuni sinaptozomiale.

Gordon<sup>(38)</sup> arată că celulele neuronale conțin mitocondrii specializate, capabile de sinteză de proteine pe o cale care este mai sensibilă la cicloheximidă decât la cloramfenicol. Este bine cunoscut faptul<sup>(19)</sup> că mitocondriile din alte țesuturi, sintetizează proteine printr-un mecanism care este inhibat de cloramfenicol și este complet rezistent la cicloheximidă.

Sinteza de proteine din mitocondriile cortexului cerebral este puternic inhibată de cicloheximidă<sup>(38,39)</sup>.

Aceste observații arată că mitocondriile din umflăturile sinaptice sînt mitocondrii specializate cu rol în sinteza acelor proteine folosite exclusiv în joncțiunea sinaptică. În același sens sînt și rezultatele care arată

că încorporarea amino-acizilor în proteine de către fracțiunea mitocondrial-sinaptosomală este inhibată de oubaină, care în același timp nu modifică activitatea respiratorie a mitocondriilor purificate<sup>(42)</sup>.

Recent, din mitocondriile cortexului cerebral au fost izolați ribozomi 80 S<sup>(37)</sup>. Din mitocondriile de ficat de șobolan, s-a izolat o formă monomerică de ribozomi 55S. Particulele ribozomale sedimentate la acest coeficient (55S), incorporează <sup>14</sup>C-leucină. Radioactivitatea specifică pentru acești ribozomi este de circa 1000 impulsuri/min/mg proteină, în timp ce mitocondriile din care aceștia sînt izolați au numai o activitate specifică de 21 impulsuri/min/mg proteină. Aceasta demonstrează rolul activ jucat de aceste particule în incorporarea mitocondrială a aminoacizilor<sup>(45, 46)</sup>. Este deci demonstrat faptul că în mitocondrii există condiții autonome pentru sinteza de proteine, găsind aici ADN, tARN (ARN de transfer), mARN (ARN mesager) și rARN (ARN ribozomal)<sup>(45)</sup>.

Sinteza de proteine mitochondriale, din punct de vedere al mecanismului funcțional, este asemănătoare celeia din sistemul microzomal citoplasmatic, chiar dacă aceasta are loc în absența fazei solubile citoplasmatică adăugate sau a pH 5 enzimelor<sup>(45,47,48,49,50)</sup>.

Este bine stabilit acum faptul că mitocondriile conțin ARN, ADN și că sînt organele cu capacitate de replicare. Se consideră că ADN din mitocondrii, conține cel puțin o parte din informația ereditară necesară



în procesul de replicare mitocondrială și în creștere. Distribuția mitocondriilor în celulă este determinată de funcția acestora și este o ilustrare ideală a interrelațiilor dintre structura și funcția celulei.

Mitocondriile livrează ATP elementelor contractile din celula musculară în vecinătatea cărora se găsesc în număr mare, mitocondriile sînt aglomerate la suprafața celulelor epiteliale livrînd ATP pentru transportul activ. Deasemeni reticulul endoplasmatic este distribuit în straturi circulare cu un bogat conținut în ribozomi, în jurul mitocondriilor din celule cu o sinteză activă de proteine și deasemeni în unele celule mitocondriile sînt dispuse în imediata apropiere a picăturilor de grăsime<sup>(51)</sup>.

Adesea mitocondriile sînt prezentate ca un exemplu special a unei categorii mai mari de organele definite ca plastide. Astfel celulele vegetale conțin pe lîngă mitocondrii și leucoplaste care sînt plastide implicate în transformarea glucozei în amidon, conțin deasemenea chromoplaste care sînt locul de sinteză și de localizare a celor mai mulți pigmenți ai plantelor și în sfîrșit conțin cele mai importante plastide care sînt chloroplastele organele în care are loc procesul de fotosinteză.

Cloroplastele în celulele plantelor eucariotice sînt înconjurate cu un înveliș dublu membranar cu membrane deosebite formînd în interior o structură puternic laminată. La plantele superioare cea mai mare

parte a structurii laminate este concentrată într-un fel de saci întinși, denumiți "discuri" sau "thylakoidi" și care frecvent se strâng într-un fel de aglomerări denumite "grana", cu mai multe "grana" pentru fiecare plastid.

La plantele inferioare ca algele verzi, discurile sînt la fel de mari ca și plastidul și sînt unite într-o singură "grana".

În celulele fotosintetice procariotice ca bacteriile fotosintetice nu necesită cloroplaste ca organele separate și sistemul membranal fie că este laminat, fie că este vezicular este distribuit în interiorul celulei, fiind concentrat în apropierea membranei celulare.

Sistemul fotosintetic de transport de electroni, la celulele vegetale, este conținut într-o structură membranală - cloroplastul - după cum sistemul de transport de electroni din celula animală, este conținut în membranele mitocondriale.

Procesul de fotosinteză necesită două componente separate:

- un sistem membranal, asociat cu procesul de fotosinteză,

- un sistem granular, descoperit recent în cloroplaste. Acesta este constituit din granule în formă de sfere turtite cu un diametru de circa 100 Å. Aceste granule poartă denumirea de "quantosomi" și conțin clorofilă și enzimele necesare etapei inițiale a procesului



de fotosinteză. Cloroplastele ca și mitocondriile, sînt organele cu capacitate de autoreplicare și conțin ADN.<sup>(51)</sup> Atît mitocondriile cît și cloroplastele, sînt organele celulare, semiautonom care ca și virusurile, sînt capabile de reproducere și diviziune. Această capacitate pare să fie posibilă numai în condițiile în care aceste organele se găsesc în interiorul celulei și nu izolate din aceasta.

Datele obținute pînă în prezent, arată că atît cloroplastele cît și mitocondriile, au echipamentul enzimatic necesar pentru sinteza de proteine. Mitocondriile pot sintetiza multe proteine dar nu toți constituenții proteinici proprii. De exemplu, mitocondriile nu pot sintetiza citocromul c, sinteza căruia se face în ribozomi citoplasmei extramitocondriale. Siekevitz<sup>(51)</sup> presupune că ADN nuclear și nu ADN mitocondrial, conține genomii pentru sinteza citocromilor. El consideră că mitocondriile, prin aparatul ribozomal și acizi nucleici proprii, sînt capabile să sintetizeze numai "proteinele structurale" ale membranelor cristei.

Pare posibil că în timpul diviziunii celulare, mitocondriile celulei fiice sînt produse prin diviziunea mitocondriilor celulelor mamă și nu se formează de novo, din precursori nemitochondriali ai matricei citoplasmatică.

O serie de date, arată că atît mitocondriile cît și cloroplastele, au o existență semiautonomă și în sensul continuității acestor organele dintr-o generație în alta, care depinde de structura lor proprie iar la

rîndul ei, de colaborarea dintre acestea și restul celulei (51,52,53,54,55)

Din datele prezentate pînă acum, rezultă că mitocondriile cu ADN, ARN și ribozomi proprii, sînt capabile să sintetizeze proteine, care în anumite limite se aseamănă cu sinteza de proteine din citoplasmă. Sinteza de proteine din mitocondriile dr ficat de șobolan, <sup>(72)</sup> nu este inhibată de către ARN-ază și de cicloheximidă care prin urmare nu inhibă încorporarea L-[U-<sup>14</sup>C]-leucinei în proteinele mitocondriale. Penicilina și streptomycină la concentrații suficient de mari pentru a inhiba creșterea bacteriană, inhibă foarte puțin (circa 10%) încorporarea L-[U-<sup>14</sup>C]-leucinei în aceleași proteine. În schimb, cloramfenicolul și teramicina, inhibă total încorporarea amino acidului în proteinele din ficat.

Aceste date arată că sinteza mitocondrială de proteine, diferă de aceea citoplasmatică. Cardell <sup>(73)</sup> analizînd la microscopul electronic efectele hipofizectomiei asupra morfologiei celulei hepatice, ajunge la concluzia că hipofizectomia produce o ușoară creștere în volumul mitocondrial. Mitocondriile izolate din ficatul de șobolan hipofizectomizat, sînt sensibile la inhibiția decuplanților fosforilării oxidative. Hipofizectomia reduce semnificativ, capacitatea mitocondriilor de încorporare a amino acizilor in vitro. S-a demonstrat de asemenea că hipofizectomia reduce capacitatea de fosforilare oxidativă a mitocondriilor



de ficat de pisică. Injectarea de hormon somatotrop la șobolan, duce de asemeni la scăderea capacității de fosforilare oxidativă a mitocondriilor cu L- $\beta$ -hidroxi-butirat ca substrat.<sup>(74)</sup> De aici se poate trage concluzia că o capacitate de fosforilare oxidativă redusă, nu poate fi cauza scăderii capacității mitocondriilor de ficat de șobolan hipofizectomizat, pentru încorporarea amino acizilor.<sup>(75)</sup>

Nishimura, arată că în mitocondriile de ficat normal, comparativ cu mitocondriile de ficat de șobolan hipofizectomizat, conținutul în [ $^{14}\text{C}$ ]-leucil-tARN este mai mare. S-a arătat de asemeni, că hipofizectomia scade capacitatea mitocondriilor de încorporare a uridinei.<sup>(72)</sup> Tratamentul șobolanilor hipofizectomizați cu hormon somatotrop uman, duce la o creștere semnificativă a capacității de sinteză de proteine mitocondrială în ficat, măsurată prin capacitatea de încorporare a [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-leucinei in vitro și in vivo.<sup>(72)</sup>

Din studiile lui Maddaiah,<sup>(72)</sup> rezultă că hormonul somatotrop, stimulează sinteza de proteine în mitocondriile de ficat. Proteinele astfel sintetizate, deși puține la număr, reprezintă o parte importantă a structurii membranare, esențială pentru localizarea și funcționarea diferitelor componente ale lanțului de transport de electroni.<sup>(76,77)</sup>

Deosebit de interesante sînt datele, care arată că celulele de *Saccharomyces cerevisiae*, care cresc anaerob, conțin promitocondrii nerespiratorii.<sup>(78,79,80,81)</sup>

După aerarea celulelor de drojdie anaerobe, promitocondriile sînt convertite în mitocondrii respiratorii.

Această modificare diferențială necesită o colaborare strînsă între sinteza de proteine citoplasmatică și sinteza de proteine promitocondrială. Astfel, adaptarea respiratorie este blocată atît cu cicloheximidă (inhibitor al sintezei de proteine citoplasmatică) cît și cu cloramfenicol (inhibitor al sintezei de proteine mitocondrială). Contribuția individuală a acestor două sisteme de translație, poate fi separată parțial în timp. La început, sistemul de translație mitocondrial, sintetizează o serie de intermediari ai adaptării la respirație, care sînt inductibili de către oxigen. Acești intermediari se pot acumula dar nu pot singuri, să condiționeze începutul procesului respirator, pînă cînd nu se sintetizează complimentar, produși ai sintezei de proteine citoplasmatică de asemenea oxigen-inductibile.

S-au adus dovezi experimentale care precizează faptul că oxigenul, controlează translația pentru o clasă de proteine specifice la nivelul ribozomilor promitocondriali.<sup>(83)</sup> Oxigenul induce sinteza unor proteine în promitocondrii cu o greutate moleculară între 30.000 și 42.000. Această sinteză este complet inhibată de cloramfenicol (4mg/ml), de eritromicină (2mg/ml), și de acriflavină (12,5  $\mu$ g/ml).<sup>(83)</sup> Sinteza de proteine promitocondriale indusă de oxigen, este inhibată și de o concentrație de 3,6% glucoză. Acriflavina inhibă



specific transcripția ADN mitocondrial din drojdie<sup>(84)</sup>. Această inhibiție a dus la următoarele concluzii:

-Sinteza de proteine controlată de oxigen este codificată de ADN mitocondrial.

-mARN mitocondrial are un timp de înjumătățire  $3\frac{1}{2}$  -  $4\frac{1}{2}$  minute, deci foarte scurt.

-Foarte puțin mARN poate fi introdus în mitocondriile din citoplasmă.

În timpul adaptării la aerobioză a celulelor de drojdie anaerobe apar modificări în structura hemoproteinelor. Studiind spectrofotometric<sup>(267)</sup> adaptarea respiratorie la *Saccharomyces cerevisiae* s-au observat tranziții spectrale de la citocromul  $b_1$  (cu bandă alfa de 557,5 și 551 nm), la citocromii b (559 nm), citocromul c (548 nm), și apariția citocromului  $c_1$  (cu bandă alfa de 554 nm).

În studii recente s-a demonstrat că în timpul adaptării la aerobioză a celulelor de drojdie, atât creșterea capacității respiratorii<sup>(268)</sup> cât și sinteza de citocromi<sup>(170)</sup> sînt inhibate de o mixtură de cloramfenicol și cicloheximidă.

Cartledge<sup>(270)</sup> arată că după sfărîmarea mecanică a sferoplastelor de *S. carlsbergensis*, după 5 ore de adaptare respiratorie, se obține o suspensie mitocondrială ce conține toți citocromii de tip a și c. Membrana mitocondrială devine mai fragilă.

Raportul citocromilor de tip a față de citocromii b și c este variabil în diferite etape ale procesului de

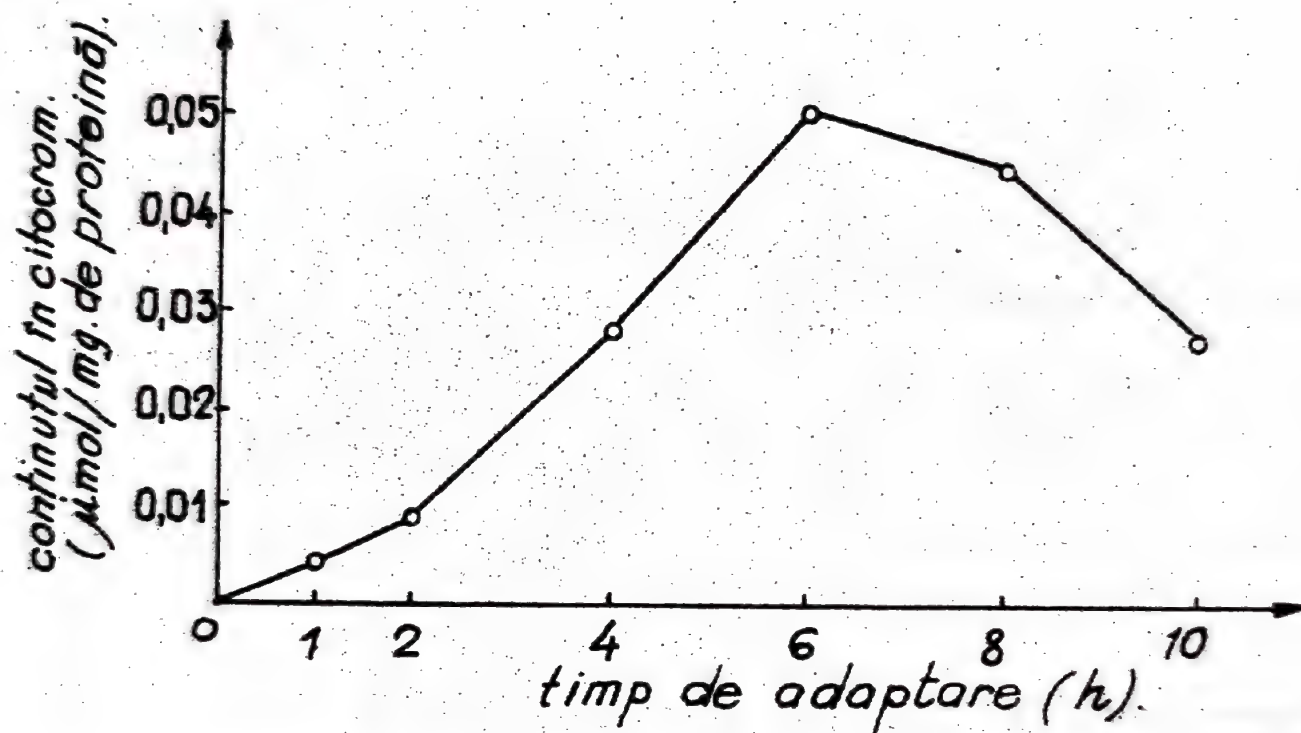
adaptare. Asamblarea lanțului transportor de electroni se dezvoltă pe măsură ce componentele individuale ale acestuia se sintetizează. Numai la conținuturi ridicate de citocromi, ca cele găsite în celulele ce respiră apar interacțiuni citocrom-citocrom specifice lanțului respirator.

Din tabelul de mai jos se vede timpul de înjumătățire în miliseconde pentru oxidare în suspensii mitocondriale<sup>(270)</sup>.

Cito- cromi	Timpul de adaptare al celulelor									Celule ce cresc aerob
	30'	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	
a <sub>3</sub>	~50	~50	~20	0,5	0,3	0,5	0,7	0,35	0,25	0,3
a				20	4	6	15	3,7	3	5
c	~100	<100	30	20	25	6,5	50	10	<15	<100
c <sub>1</sub>		<100		45	25		70		30	
b <sub>560</sub>		200		150		100	90			
b <sub>566</sub>		Nu se oxidează.		500		>200	Re- du- cere			

Din figura de mai jos se vede conținutul în citocrom a + a<sub>3</sub> în diferite stadii ale adaptării respiratorii.





Conținutul în citocrom  $a+a_3$  din fracțiunea mitocondrială din *S. carlsbergensis* la diferite stadii de adaptare.

Conținutul în citocrom a fost calculat din modificările de E observate la 445-458 nm.

Deci celulele de *S.cerevisiae* provenind din culturi anaerobe nu posedă mitocondrii și nici lanț respirator<sup>(271,272)</sup> dar conțin promitocondrii<sup>(273)</sup>.

În prezența oxigenului molecular ca indicator specific, în câteva ore se produce sinteza sistemului respirator, și în special al citocromilor după cum am mai arătat și apar mitocondriile funcționale<sup>(271)</sup>.

Glucoza în concentrații mari reprimă acest proces<sup>(274)</sup> iar galactoză favorizează acest proces în calitate de sursă de energie în mediu<sup>(275)</sup>.

Van Wijk<sup>(276)</sup> a arătat că concentrația de 3',5'-AMP este de 6 ori mai mare la celulele cultivate în prezență de galactoză decât la celulele cultivate în prezență de glucoză. Prin urmare represia sintezei sistemului respirator poate fi dependentă de cantitatea de AMP<sub>c</sub> intracelular. De aceea este logic să presupunem că AMP<sub>c</sub> imprimă celulelor de drojdie o viteză de adaptare respiratorie, și aceasta în mod deosebit atunci când în mediu de cultură se găsește glucoza. Experimental s-a demonstrat că sinteza de protohem și deci a citocromului c este un fenomen discontinuu, iar Barrett<sup>(277)</sup> demonstrează că formarea nucleilor hematinici (hemul b, c și a) se efectuează de novo și că în celula anaerobă nu există niciun fel de rezervă de hem de la care aceste grupări prostetice ar putea să se sintetizeze.

Groot<sup>(83)</sup> arată că citocrom oxidaza din celulele de drojdie aerobe conține 6 lanțuri polipepti-



dice diferite dintre care pentru trei s-a demonstrat translația la nivelul ribozomilor mitocondriali. Două dintre aceste polipeptide au aceeași greutate moleculară (34000 și 42000) ca și produșii proteici ai translației controlate de oxigen în mitocondrii, descriși mai sus. S-ar putea ca acești produși să fie asociați cu citocrom oxidaza ca subunități ai acestei enzime, a cărei sinteză se știe că este dependentă de oxigen și inhibată de glucoză, cloramfenicol și eritromicină.<sup>(85)</sup> Rubin și Tzagoloff<sup>(86)</sup> studiind originea biosintetică a citocrom oxidazei în legătură cu sinteza de proteine din mitocondrii și citoplasmă, găsesc că trei din subunitățile mari polipeptidice ale citocrom oxidazei sînt transcrise la nivelul ribozomilor mitocondriali. Citocrom oxidaza din drojdie ar conține șapte subunități polipeptidice<sup>(86,87)</sup> cu greutăți moleculare între 35000 și 8600. Acești autori aduc argumente experimentale prin tehnici de imunoprecipitare pentru a arăta că șapte subunități proteice ale citocrom oxidazei din drojdie sînt sintetizate în mitocondrie. Studiindu-se sinteza citocrom oxidazei la *Neurospora crassa* s-a demonstrat că în mitocondrii se sintetizează trei subunități proteice cu greutăți moleculare de 36000, 28000 și 20000.<sup>(88,89)</sup> Studiind biosinteza glutamat dehidrogenazei din ficatul de șobolan, Godinot și Lardy,<sup>(133)</sup> demonstrează că aceasta are loc în microzomi. Glutamat dehidrogenaza din ficatul de șobolan este localizată în matricea mitocondrială<sup>(134,135,136)</sup>. Parțial această enzimă este legată de

membrana internă<sup>(136)</sup>. Incorporarea de  $^{14}\text{C}$ -izoleucină în subunitățile glutamat dehidrogenazei din ficat a arătat că aceasta are loc inițial în enzima legată de microzomi și apoi în glutamat dehidrogenaza din mitocondrii<sup>(133)</sup>. Glutamat dehidrogenaza microzomală, extrasă în tampon fosfat, s-a prezentat într-o formă la fel de activă ca și enzima din mitocondrii.

Glutamat dehidrogenaza radioactivă purificată, adăugată la omogenate de ficat a fost legată atât de membrana mitocondrială cât și de membranele microzomale în timpul fracționării omogenatului. Se presupune că glutamat dehidrogenaza poate fi temporar legată de microzomi prin legături lipido-proteice și apoi poate fi translocată în mitocondrii.

Beattie<sup>(137)</sup> arată că mitocondriile au o capacitate de sinteză de proteine limitată, și că multe proteine mitocondriale sînt sintetizate în alte regiuni ale celulei. Aceasta este valabil nu numai pentru celulele mamiferelor, dar și pentru celulele organismelor inferioare, ca *Neurospora crassa*<sup>(138)</sup>.

S-a demonstrat că cea mai mare parte a proteinelor mitocondriale solubile, se sintetizează în afara mitocondriilor și că numai un număr restrîns de proteine mai puțin solubile, este sintetizat în mitocondrii<sup>(133)</sup>.

Distrugerea și reînnoirea mitocondriilor se face prin mecanisme care sînt încă neclare. Astfel în 1961, Fletcher<sup>(245)</sup> arată că viteza de reînnoire a citocromului c, a fosfolipidelor totale, a proteinelor solu-



bile și insolubile din mitocondrii este aproximativ egală și anume, toate aceste componente au timp de înjumătățire de circa 9-11 zile.

Aceste fapte ne fac să presupunem că mitocondriile sînt sintetizate și degradate ca un tot unitar.

Beattie<sup>(246)</sup> observă în schimb că o parte din fracțiunile proteice au o viteză de reînnoire identică, în timp ce alte proteine solubile au o viteză de reînnoire mult mai mare.

Bartley<sup>(247)</sup> arată că proteinele mitocondriale și fosfolipidele totale au o viteză de reînnoire similară. Datorită faptului că în structura mitocondrială găsim două componente structurale majore și anume membrana internă și externă, este foarte posibil ca sinteza și degradarea acestor membrane, să aibă loc pe căi diferite. Enzime ca  $\alpha$ -aminolevulinic acid sintetaza<sup>(248)</sup> și ornitinamino transferaza și alaninamino transferaza<sup>(249)</sup>, au o viteză de reînnoire mult mai mare decît cea a altor componente mitocondriale.

S-a observat că ADN mitocondrial reprezintă una dintre puținele componente structurale ale mitocondriilor care poate fi obținută în stare pură. ADN este localizat în matricea mitocondrială<sup>(250)</sup>, iar în celulele de drojdie este asociat cu structura mezozomală<sup>(251)</sup>.

În tabelul de mai jos este indicat timpul de înjumătățire a constituenților mitocondriali din diferite țesuturi la șobolan.

Organ sau consti- tuent	Timpu de în- jumătățire în zile	Indicații bibliografice
Ficat		
Lipide	10,6	245
Proteine solubile	10,8	245
Proteine insolubile	10,1	245
Citocrom c	9,7	245
Proteine totale mi- tocondriale	8,4	246
Proteine hidrosolu- bile	8,6	246
Citocrom c	8,6	246
Proteine contractile	8,4	246
Proteine structurale	8,8	246
Alți citocromi	8,2	246
Proteine hidrosolubile	4,2-5,1	249
Proteine solubile în 0,9% KCl	4,5-5,0	249
Proteine solubile în 0,6M KCl	4,6-5,3	249
Fracțiune 13% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,3-5,3	249
Fracțiune 35% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,9-4,8	249
Reziduu	4,7-8,8	249
Proteine insolubile	9,0	247
Fosfolipide	10	247
ADN mitocondrial	7-10	252



ADN mitocondrial	$9,4 \pm 0,7$	253
Cardiolipină	$11,5 \pm 0,8$	253
Lecitină	$10,0 \pm 1,3$	253
Fosfatidiletanol-amină	$9,9 \pm 1$	253
Sfingomielină	$11,4 \pm 1,2$	253
<b>Rinichi</b>		
Mitocondrii intacte	8,7	246
Proteine hidrosolubile	6,0	246
Proteine solubile în KCl	7,6	246
Proteine structurale	9,0	246
Alți citocromi	8,4	246
ADN mitocondrial	$10,4 \pm 1,2$	253
Cardiolipină	$11,4 \pm 4,5$	253
Lecitină	$10,0 \pm 2$	253
Fosfatidiletanol-amină	$17,4 \pm 3,1$	253
<b>Creier</b>		
Fosfatidiletanol-amină	22,34,35	254
Lecitină	11,19,23	254
Fosfatidilserină	27	254
Fosfatidilinozitol	29,34	254
Mitocondrii întregi	26,3	246

- 31 -

Proteine hidrosolubile	17,9	246
Proteine insolubile în apă	31,4	246
ADN mitocondrial	48,7 $\pm$ 16,0	253
Inimă		
ADN mitocondrial	6,7 $\pm$ 1,0	253
Lecitină	10,5 $\pm$ 1,0	253
Fosfatidiletanolamină	17,4 $\pm$ 3,1	253

Viteza de reînnoire a ADN nuclear este de 30 zile în ficat și diferă de viteza de reînnoire a ADN mitocondrial (9,4 zile).

Până în prezent numai pentru un număr restrâns de enzime din membrana mitocondrială internă, s-a demonstrat necesitatea produșilor de translație mitocondrială:

- Complexul ATP-azic sensibil la rutamicină, compus din cel puțin zece subunități proteice<sup>(90,91,92,93)</sup>, din care patru sînt transcrise la nivelul ribozomilor mitocondriali<sup>(94)</sup>.

- Ubichinona - citocrom c reductaza<sup>(86)</sup> și

- Citocrom oxidaza<sup>(86,87,89,95,96)</sup>.



### Structura și funcția membranelor mitocondriale.

Așa cum s-a arătat de către Palade<sup>(98)</sup> încă din 1952 în urma unor studii electronmicrografice, mitocondriile au o membrană sinuoasă iar în interiorul acestora se află un material nestructurat (matricea). Sjostrand<sup>(99)</sup> folosind secțiuni ultrafine, prin microscopie electronică, identifică la mitocondrii prezența unei membrane duble. Aceste observații au fost confirmate și de Palade care consideră că cristele mitocondriale reprezintă falduri ale membranei interne. El apreciază că structura mitocondrială este aceea a două camere legate între ele prin două membrane separate. Camera externă, denumită și spațiu intermembranar și care este delimitată de membranele externă și internă, în timp ce camera internă sau matricea este închisă complet de membrana internă, a cărei criste pătrund în interior.<sup>(100,101)</sup>

Fernandez-Moran<sup>(102)</sup> observă la colorarea negativă a membranei mitocondriale interne, prezența unor mici subunități în formă de ciupercă, dispuse la intervale egale în spațiul intramatriceal.

Aceste formațiuni sferice au un diametru de 85 Å și au fost identificate cu ATP-aza mitocondrială.<sup>(103)</sup>

După tratament cu ultrasunete, din mitocondrii de inimă de bou, se obțin particule submitocondriale care catalizează fosforilarea oxidativă, schim-

bul fosfor anorganic ( $P_a$ ) - ATP și hidroliza ATP. Tratatamentul acestor particule submitocondriale cu tripsină continuă să catalizeze fosforilarea oxidativă și hidroliza ATP. Tratarea mai departe a acestor particule cu uree, scade puternic atât fosforilarea oxidativă cât și activitatea ATP-azică. Pierderea activității ATP-zice corespunde morfologic dispariției formațiilor în formă de ciupercă amintite mai sus. (103,104)

Cu ajutorul ATP-azei marcată cu tritium ( $^3H$ ) s-a observat că tratamentul particulelor submitocondriale reconstruite cu uree 2M, duce la o pierdere a radioactivității care corespunde dispariției sferelor de pe membrana internă. Intrucît tratamentul cu uree 2 M este un procedeu drastic, s-au considerat necesare tratamente mai blînde pentru inactivarea ATP-azei, pentru a evalua relația dintre ATP-ază și sferele de pe membrana internă.

Inactivarea ATP-azei prin răcire este semnificativ accelerată de unii anioni. (105) Deosebit de efectivi s-au arătat iodura de potasiu și sulfocianura de potasiu. Acești ioni rup sferele de pe membrana internă și totodată se pierde și activitatea ATP-azică.

În membrana mitocondrială externă s-au găsit subunități mai mici ca dimensiuni (60 Å) și într-o aranjare mai puțin ordonată. (106,107)

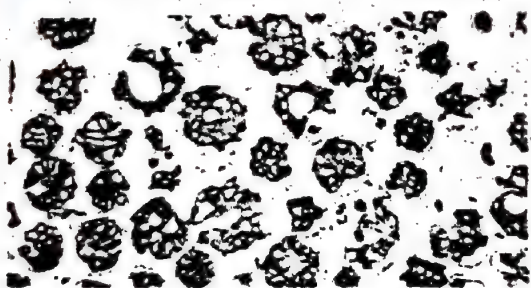
Ca răspuns la diferite condiții, mitocondriile dintr-un număr mare de surse își schimbă forma și volumul. Hackenbrook (108) arată că în mitocondriile de ficat de



şobolan, ultrastructura membranei interne este influenţată de starea metabolică. Se disting două forme mitochondriale la examenul electronomicoscopic:

- o formă ortodoxă, "bogată în energie"
- o formă condensată, "săracă în energie"

În starea condensată, matricea este strînsă la un loc şi prin urmare mai puternic colorată. Dacă aceste mitochondrii sînt puse să respire în prezenţă de substrat şi  $P_a$  membrana internă se întinde şi ia forma ortodoxă. Mitochondria revine la forma condensată la adăugare de ADP(108,109,110)



(a) Forma condensată .



(b) Forma ortodoxă.

Mitochondrii de ficat de şobolan (x 27.000)

S-au descris în mitocondrii<sup>(111)</sup> modificări ultrastructurale reversibile care au fost atribuite modificărilor osmotice datorite "mişcării de ioni energizați". Modificări osmotice similare au fost observate în timpul acumulării ionilor de calciu și considerate că reprezintă un alt tip de modificări ultrastructurale<sup>(113)</sup>

Green<sup>(114)</sup> constată modificări structurale ale membranei interne mitocondriale datorită conversiei energiei transportului de electroni, în energie conformațională ce poate fi folosită direct pentru sinteza de ATP. Aceste modificări pot fi prevenite cu decuplanți sau inhibitori.

Weinbach<sup>(115)</sup> arată că deși fosforilarea oxidativă decuplată din mitocondriile de ficat de șobolan poate fi restaurată cu ajutorul albuminei serice, nu s-a reușit și o restaurare a structurii normale. S-a considerat că ATP sau intermediarii bogați în energie generați în timpul fosforilării recuplate, au un efect mai puțin evident asupra alterărilor morfologice mitocondriale.

Modificări structurale ale mitocondriilor de inimă de bou determinate osmotice, au fost descrise și de alți autori<sup>(116,117)</sup>

Adăugarea de ADP este suficientă pentru a converti mitocondriile într-o stare condensată "neenergizată" care nu se mai modifică la adăugare de substrat și  $F_a$ .



Cu toate că în aceste condițiuni se formează ATP, ultrastructura membranei interne determinată electronmicroscopic rămâne nemodificată<sup>(118)</sup>.

Modificări conformaționale reversibile<sup>(119)</sup> pot fi induse în particulele submitocondriale, prin modificări de pH.

Intrucât în timpul respirației au loc mișcări de protoni,<sup>(120)</sup> aceste modificări conformaționale par să fie secundare față de transportul de electroni și nelegate direct de conservarea energiei. Mitocondriile de ficat de șobolan care se fixează cu 0,8% glutaraldehydă, în raport cu modificările osmotice din membrană pot încă să oxideze substratele și să folosească energia obținută din această oxidare<sup>(121)</sup> pentru acumularea de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Toate aceste date arată că variațiile morfologice importante observate în structura membranei interne mitocondriale sînt reale, dar nu pot fi necondiționat legate de activitatea metabolică. O parte din autori leagă aceste modificări ultrastructurale de activitatea osmotică, le consideră secundare transportului de ioni. Dar întrucât acesta este legat de starea metabolică a mitocondriei, nu este surprinzător faptul că în condiții controlate pot fi găsite relații însemnate între starea metabolică și conformația membranei mitocondriale interne.

În 1962 Lehninger<sup>(122)</sup> arată că pe lângă modificările de volum "de mică amplitudine", care sînt

reversibile, pot fi întâlnite și modificări de mare amplitudine" cunoscute sub denumirea de umflare (swelling) și contracție mitocondrială. O parte din aceste modificări sînt reversibile, unele însă sînt ireversibile și merg pînă la ruperea membranei externe.

Sottacasa<sup>(123)</sup> și Parsons<sup>(124)</sup> pun la punct o tehnică pentru separarea membranelor interne și externe în care umflarea și contracția mitocondrială este urmată de centrifugare în gradient de densitate. Modificări în volum a mitocondriilor au fost folosite cu succes și în analiza transportului de anioni descoperindu-se unele canale specifice pentru anioni prin membrana mitocondrială internă.<sup>(125)</sup>

Prin procedee mai drastice, membrana mitocondrială este ruptă cu formarea din membrana internă de particule submitocondriale.

Mitocondriile de ficat de șobolan distruse cu digitonină își păstrează activitatea fosforilantă.<sup>(126, 127)</sup> Particulele submitocondriale preparate cu această metodă păstrează membrana internă a sferelor orientate spre interiorul veziculelor<sup>(120)</sup>, în timp ce particulele submitocondriale obținute cu tratament cu ultrasunete au membrana internă a sferelor orientată spre mediu, spre exterior.<sup>(128, 129)</sup> Tratarea mitocondriilor de ficat cu digitonină duce așa cum s-a mai arătat, la izolarea de particule submitocondriale folosite cu succes în procesele de fosforilare oxidativă.<sup>(144)</sup> În studii electron-micrografice Siekevitz<sup>(145)</sup> arată



că aceste particule au un diametru între 200-500 Å și se prezintă în diferite stadii de agregare.

Levy<sup>(146)</sup> demonstrează că digitonina separă preferențial membrana externă. Complexul mitochondrial intern rezultat poate fi mai departe separat cu digitonină.<sup>(147)</sup>

Separarea membranei externe poate fi evaluată enzimatic prin măsurarea pierderii activității unei enzime localizată exclusiv în această porțiune a mitocondriei. O astfel de enzimă este NAD-citocrom c reductaza (insensibilă la rotenon).<sup>(147,148,149,150)</sup>

Suspendarea mitocondriilor în soluție 0,25M zaharoză cu digitonină în concentrație finală de 1%, cu un raport de 1,1 mg digitonină/10 mg proteină duce la separarea completă a membranei externe mitochondriale la o centrifugare puternică de 105000 x g.

După separarea membranei externe, supernatantul poate fi din nou tratat cu digitonină ceea ce are ca rezultat ruperea membranei interne evidențiată și la examenul electron-microscopic.<sup>(147)</sup>

În urma acestui tratament membrana internă este fragmentată în particule mici rezultate din complexul membrar intern.

Așa cum am mai arătat, membrana externă are ca enzimă "marker" NADH-citocrom c reductaza. Această enzimă se mai găsește în celulă și în fracțiunea microsomală, care conține ca enzimă "marker" pentru aceasta, o NADPH-citocrom c reductază, localizată exclusiv în microzomi.

Lipsa activității acestei enzime din preparatul de membrană externă mitocondrială este un criteriu de puritate a acestui preparat, excluzând contaminarea cu microzomi a acestuia.

După separarea membranei externe așa cum am arătat, în supernatant rămâne complexul membranar intern mitocondrial, care conține 50-60% din proteinele totale mitocondriale, membrana externă conținând numai 10% din proteinele totale. Restul de proteine, par să fie asociate cu faza solubilă din mitocondrie .

Studiind modul de acțiune al digitoninei se presupune că aceasta acționează prin solubilizarea lipoproteinelor din structura membranară.

S-a presupus deasemeni că digitonina se poate combina cu colesterolul pentru a forma digitonide și că aceasta ar duce la solubilizarea sau distrugerea membranelor. (151)

În 1957 Siekevitz<sup>(152)</sup> arată că digitonina acționează asupra mitocondriilor din ficat într-un mod cu totul deosebit de acela al deoxicolatului. Dacă un strat de mitocondrii este acoperit cu deoxicolat și se fac secțiuni în diferite puncte ale stratului se observă că mitocondriile sînt umflate și distruse în raport direct proporțional cu cantitatea de deoxicolat care a străpuns stratul. Digitonina însă nu produce etape intermediare între mitocondria intactă și particulele submitocondriale rupte în urma tratamentului.



Conținutul relativ scăzut în succinic oxidază, citocrom oxidază și citocromii de tip a din membrana externă<sup>(148,149)</sup> este un indiciu că lanțul respirator și prin urmare și fosforilarea oxidativă este asociat cu porțiunea internă a mitocondriei și nu cu membrana internă.

Newman<sup>(153)</sup> studiind conținutul în fosfolipide și compoziția în acizi grași a acestora din mitocondrii de ficat, constată o concentrație de fosfolipide de 0,163  $\mu$ g atomi de fosfor fosfolipidic/mg de proteină. Acest raport scade la 0,118 după separarea membranei externe și crește la 0,292 după distrugerea membranei interne cu digitonină.

Analizând distribuția P-fosfolipidic în diferitele fosfolipide din mitocondrii s-a observat următoarea distribuție:

Repartiția fosfolipidelor în mitocondrii de ficat de șobolan (% P-fosfolipidic )<sup>(153)</sup>

Fosfatidil-colina	41,0 $\pm$ 0,5
Fosfatidil-etanol amina	35,6 $\pm$ 5,6
Cardiolipina	12,7 $\pm$ 3,5
Fosfatidil-inozitol	4,6 $\pm$ 3,8
Lizolecitină + sfingomielină	2,7 $\pm$ 2,4

După cum este cunoscut, lanțul transportor de electroni din mitocondriile de inimă de bovine, a fost

separat în patru complexe funcționale enzimatică<sup>(241)</sup>. Toate aceste complexe sînt bogate în fosfolipide. În depărtarea componentei lipidice, duce la pierderea activităților enzimatică; adăugarea de fosfolipide reface această activitate. Incercările de a scinda aceste complexe în subunități proteice, duc la pierderea totală a activității enzimatică organizate. Aceste observații conduc la concluzia, că lanțul transportor de electroni există in vivo, în unități funcționale și morfologice, care nu sînt nici mai mici și nici nu au o compoziție mai simplă decît aceea a complexelor active.

Fernandez-Moran<sup>(242)</sup> identifică în cristalele mitocondriale, o unitate macromoleculară care se repetă. Ulterior, s-a găsit un mozaic de unități discrete, de dimensiuni mai mici de 90 Å diametru și care constituie ultrastructura complexelor transportoare de electroni<sup>(243)</sup>. Dacă complexul IV din lanțul respirator (citocrom oxidaza) este solubilizat cu acizi biliari, se constată o tendință de agregare a unor subunități particulare, cu diametrul de 50-100 Å. Dacă acizii biliari sînt îndepărtați (prin dializă și spălare), subunitățile particulare se organizează în structuri veziculare membranare. Îndepărtarea fosfolipidelor din citocrom oxidază, elimină capacitatea subunităților de a se organiza în vezicule.<sup>(241)</sup> De aci concluzia că citocrom oxidaza deficientă în fosfolipide nu se poate organiza în membrane. Dacă acestor preparate, li se adaugă componente fosfolipidice, veziculele formate, nu diferă cu nimic de



acelea ale enzimei originare. Deci fosfolipidele reprezintă elementele structurale în formarea membranelor veziculare din citocrom oxidază. Si cercetările lui Fernandez-Moran au arătat că preparatele de particule transportoare de electroni, reduse, sînt formate în întregime din vezicule ale cristei mitocondriale.<sup>(243)</sup> Astfel de vezicule posedă capacitatea de transfer de electroni<sup>(244)</sup> și sînt capabile să cupleze la transferul de electroni, fosforilarea ADP-ului.

Citocrom oxidaza este o enzimă puternic legată de membrană și este fără îndoială o parte a cristei mitocondriale.

Interesante modificări morfologice ale membranei interne au fost produse în mitocondriile de inimă de bou, prin tratarea acestora cu fosfolipază C. Structurile obținute cu acest tratament reprezintă forme intermediare între mitocondrii și particule submitocondriale. Aceste forme se comportă în teste funcționale, ca particule submitocondriale. În secțiuni efectuate în serie s-a observat că aceste structuri, constau din particule submitocondriale ale membranei interne, adunate de-o parte și de alta a membranei mitocondriale.

Modificări morfologice similare<sup>(131)</sup> s-au obținut și la tratamentul cu fosfolipază A.

Tratamente mai drastice asupra mitocondriilor, au dus la modificări morfologice importante care însă nu totdeauna au condiționat și alterări corespunzătoare ale funcțiilor acestor organele.<sup>(132)</sup>

Yu<sup>(139)</sup> arată că extracția ubichinonei din mitocondriile de inimă de bou, duce la inactivarea NADH oxidazei și a succinat oxidazei din particulele submitocondriale. Inactivarea este reversibilă la adăugare de ubichinonă. Efecte similare constată și alți autori.<sup>(140,141,142)</sup>

Extragerea fosfolipidelor din particulele mitocondriale, cu soluție apoasă de acetonă, sau prin digestie cu fosfolipaze, duce la inactivarea respirației, inactivare care este reversibilă la adăugare de fosfolipide.<sup>(143)</sup>

Inactivarea cu fosfolipaza C a transportului de electroni mitocondrial demonstrează rolul fosfolipidelor în acest proces.

Fosfolipaza A, C, și D, inhibă activitatea succinic oxidazică, iar adăugarea de fosfolipide extrase din soia, protejează activitatea enzimei.<sup>(154)</sup> Indepărtarea fosfolipidelor cu acetonă, duce la o inhibare a respirației, care este reversibilă la adăugare de fosfolipide.

O analiză mai temeinică a acestui efect, a arătat că mitocondriile întregre sînt insensibile la inhibiția cu fosfolipaze, în timp ce particulele submitocondriale arată o sensibilitate foarte mare. Oxidarea NADH -ului este mult mai sensibilă decît oxidarea succinatului. Dacă particulele submitocondriale sînt tratate cu fosfolipază C, întreaga activitate NADH oxidazică se pierde.

Aceste date, arată o sensibilitate puternică



(156,157)

a segmentului NADH - ubichinona, la lipoliză.

Avantajul folosirii fosfolipazei C constă că în timp ce produși ai acțiunii fosfolipazei A asupra fosfolipidelor - acizi grași și lizolecitină - sînt deosebit de toxici pentru fosforilarea oxidativă, fosforilcolina și digliceridele, produși ai acțiunii fosfolipazei C nu influențează acest proces.

Interesant este faptul că adăugarea de cantități mari de albumină serică, restaurează parțial fosforilarea oxidativă înhibată cu acizi grași și lizolecitină. Incercări de restaurare a lanțului respirator după tratamentul cu fosfolipaze, par să aibă șanse mai mari după digestia cu fosfolipaza C, decît după digestia cu fosfolipaza A. Fosfolipaza C în prezența ionilor de  $Mg^{2+}$  și  $Mn^{2+}$  inhibă schimbul  $^{32}P$  - ATP și raportul P/O cu circa 30-60% Adăugarea factorilor de cuplare (157) restaurează fosforilarea legată de oxidare din particulele submitocondriale.

Tratarea particulelor submitocondriale cu cholat 0,5 % și precipitarea în soluție de sulfat de amoniu 40 % duce la obținerea unui preparat care conține integral citocromul b și  $c_1$  dar care pierde total activitatea succinat citocrom c reductazică. Adăugarea de coenzimă Q și de fosfatidil etanolamină, sau cardiolipină, reface total activitatea succinat citocrom c reductazică. (139) Acțiunea coenzimei Q nu este posibilă în absența fosfolipidelor, după cum și acțiunea reactivantă a fosfolipidelor nu este posibilă în absența coenzimei Q.



Refacerea activității este sensibilă la antimycină A.

Membrana mitocondrială externă conține 0,83mg fosfolipide/mg proteină.

Membrana mitocondrială internă are un conținut mai mic în fosfolipide și anume 0,28mg fosfolipide per mg.proteină.<sup>(158)</sup>

Conținutul în cardiolipine este de peste 7 ori mai mare în membrana internă decât în membrana externă; în timp ce fosfatidil inozitolul și fosfatidil serina sînt mai concentrate în membrana externă.

Cantități aproape egale de fosfatidil colina și fosfatidil etanolamina au fost găsite în cele două membrane mitocondriale.<sup>(158,159)</sup>

Membrana externă conține colesterol circa 30mg/mg proteină, la fel ca microzomii. Ernster și Kuylenstierna<sup>(160)</sup> indică următoarea repartizare a diferitelor enzime în compartimentele mitocondriale:

Localizarea unor enzime în mitocondriile  
de ficat de sobolan.<sup>(160)</sup>

Membrana externă.

1. NADH citocrom c reductaza insensibilă la rotenonă
2. Monoamino oxidaza
3. Kinurenin hidroxilaza
4. Acil gras-CoA sintetaza ATP-dependentă
5. Glicerolfosfat aciltransferaza



6. Lizofosfatidat aciltransferaza
7. Lizolecitin aciltransferaza
8. Colin fosfotransferaza
9. Fosfatidat fosfataza
10. Fosfolipaza A<sub>11</sub>
11. Nucleozid difosfokinaza
12. Sistemul de alungire al acizilor grași
13. Xilitol dehidrogenaza ( NAD-specifică)
14. Tiokinazele acizilor grași

#### Spațiul intermembranar

1. Adenilat kinaza
2. Nucleozid monofosfokinaza
3. Nucleozid difosfokinaza
4. Xilitol dehidrogenaza (NAD-specifică)

#### Membrana internă

1. Lanțul respirator
  - Citocromul b
  - Citocromul c<sub>1</sub>
  - Citocromul c
  - Citocromul a
  - Citocromul a<sub>3</sub>
  - Coenzima QH<sub>2</sub> - citocrom c reductaza
  - Succinat dehidrogenaza
  - Succinat citocrom c reductaza
  - Succinat oxidaza
  - NADHcitocrom c reductaza sensibilă la rotenon

- NADH oxidaza
  - Colin citocrom c reductaza
  - Citocrom c oxidaza
  - Particule fosforilante legate de lanțul respirator
2.  $\beta$ -Hidroxiacil-CoA dehidrogenaza
  3. Ferochelataza
  4. Acid  $\delta$ -aminolevulinic sintetaza
  5. Carnitin palmitiltransferaza
  6. Sistemul enzimatic al oxidării acizilor grași
  7. Sistemul enzimatic de alungire al acizilor grași
  8. Xilitol dehidrogenaza (NADP-dependentă)
  9. ATP-aza sensibilă la rutamicynă
  10. ATP - sintetaze
  11.  $\alpha$  - cetoacid dehidrogenaze

### Matricea

1. Glutamat dehidrogenaza
2. Malat dehidrogenaza
3. Izocitrat dehidrogenaza
4.  $\alpha$  - cetoglutarat dehidrogenaza
5. Citrat sintetaza
6. Aconitaza
7. Fumaraza
8. Piruvat carboxilaza
9. Fosfoenolpiruvat carboxikinaza
10. Aspartat aminotransferaza



11. Ornitin carbamilttransferaza
12. Acil gras CoA sintetaze
13. Sistemele enzimaticice pentru oxidarea acizilor grași
14. Xilitol dehidrogenaza (NADP - specifică)

Pe baza caracteristicilor morfologice, s-au adus argumente pentru ipoteza existenței unei direcționalități funcționale în membrana mitocondrială internă (255,256,257)

S-a constatat că succinatul este oxidat la nivelul suprafeței interne (matriciale) a membranei interne, (258,259,260) în timp ce citocromul c este accesibil pe suprafața externă a membranei interne (261,262)

Pe baza acestor constatări și ale altor observații s-a ajuns la concluzia că componentele lanțului respirator sînt orientate transversal în interiorul membranei. (262)

Aceste rezultate arată că suprafața internă și externă a membranei interne sînt diferite din punct de vedere chimic.

Asimetria chimică a celor două suprafețe corespunde unei asimetrii a densității celor două suprafețe ale membranei studiate electronmicroscopic și deci unei asimetrii în asamblarea constituenților macromoleculari ai membranei interne și sprijină ipoteza organizării vectoriale a componentilor lanțului respirator în interiorul membranei.

Klingenberg<sup>(161)</sup> studiind permeabilitatea membranelor mitocondriale remarcă faptul că membrana externă este ușor permeabilă pentru substanțe cu greutate moleculară mică (nucleotide). Chappell<sup>(125)</sup> arată că în membrana mitocondrială internă există sisteme, specifice pentru transportul ATP-ului și citratului.

Tzagoloff<sup>(162)</sup> studiind complexele de transfer de electroni din celulele mamiferelor și de drojdie ajunge la concluzia că acestea au aceleași componente oxido-reducătoare demonstrate atât prin proprietățile spectrale cât și prin compoziția preparatelor enzimatice. Astfel se demonstrează că citocrom oxidaza și ATP-aza rutamioyn senzitive atât din mitocondriile de drojdie cât și din mitocondriile de celule de inimă de bovine necesită pentru activitate prezența fosfolipidelor. (162,163,164)

Studiind sinteza ATP-azei mitocondriale (asa numitul factor  $F_1$ ) s-a constatat că aceasta este diminuată de glucoză.

Activitatea ATP-azei mitocondriale crește în depresie. Depresia, după represiia cu glucoză este inhibată de cicloheximidă și este insensibilă la cloramfenicol. Aceste date sînt interpretate în sensul, că locul de sinteză a  $F_1$  este la nivelul ribozomilor citoplasmatici, de unde enzima ulterior este transportată în mitocondrie. (162,165)

Cloramfenicolul și cicloheximida, inhibă transportul de electroni în timpul depresiei. (165,166,167)



ATP-aza mitocondrială ( $F_1$ ) este o componentă importantă a membranei mitocondriale interne. Această enzimă reprezintă mai mult de 10% din masa membranei interne a mitocondriei de inimă de bou.<sup>(168)</sup> Factorul  $F_1$  reprezintă un element structural al membranei mitocondriale și de aceea sinteza acestuia în celulă constituie un aspect important al biogenezei mitocondriale.

Datele prezentate pînă aici arată că sinteza mitocondrială de proteine este implicată în formarea funcțională a mitocondriei. Astfel în celulele de drojdie s-a observat că biosinteza enzimelor mitocondriale ca cele ale complexului lanțului respirator și al complexului ATP-azic necesită participarea cooperativă atât a sistemului de sinteză de proteină citoplasmatic cît și a celui mitocondrial.<sup>(169,170,171)</sup>

S-a demonstrat cu precizie că există o sinteză de proteină mitocondrială independentă de citoplasmă, și că cicloheximida inhibitor al sintezei citoplasmatică de proteine nu afectează încorporarea amino-acizilor radioactivi în cel puțin patru fragmente proteinice de pe membrana internă mitocondrială.<sup>(171)</sup>

#### Transportul de electroni și procesul de fosforilare oxidativă.

Perechile de electroni eliberate de pe intermediarii ciclului Krebs, sînt transformați printr-un lanț în trepte de enzime transportoare de electroni cu un nivel de energie descrescîndă pînă cînd acestea pot

reduce oxigenul molecular care este ultimul acceptor de electroni în procesul de respirație celulară. În acest timp cea mai mare parte din energia liberă a acestor electroni este conservată sub formă de legături pirofosforice macroergice în structura ATP într-un proces denumit "fosforilare oxidativă". Acest proces ca și transportul de electroni este găsit în toate celulele aëro-  
be. Enzimele care catalizează aceste reacții sînt localizate în membrana internă mitocondrială, în celulele eucariotice și în membrana celulară în celulele procariotice. Aceste sisteme enzimatică ce catalizează transportul de electroni și fosforilarea oxidativă au o structură complexă și pot fi foarte greu izolate și studiate in vitro, întrucît sînt puternic legate de structura membranară. Membrana ca atare pare să fie un element esențial în procesele generatoare de energie.

#### Reacții de oxido - reducere.

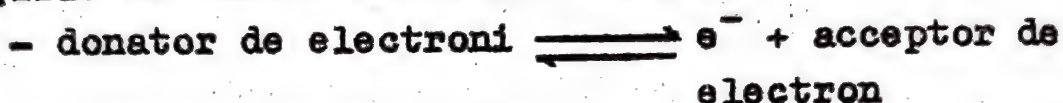
Reacțiile de oxido-reducere sînt acelea în care există un transfer de electroni de la un donator de electroni (reductant sau agent reducător) la un acceptor de electroni (oxidant sau agent de oxidare). Transferul de atomi de hidrogen este o posibilitate de transfer de electroni într-o serie de reacții de oxido-reducere. În unele reacții de oxido-reducere putem în-  
tîlni atît transfer de electroni cît și transfer de atomi de hidrogen. Electronii sau atomii de hidrogen participanți în reacțiile de oxido-reducere sînt adesea denumiți "echivalenți reducători" sau "electroni echivalenți". Agenții oxidanți și reducători de obicei



funcționează ca perechi redox conjugate sau cupluri redox asemănător conjugatilor acid-bază. Într-o reacție acid bază întâlnim:



În reacțiile de oxido-reducere întâlnim:



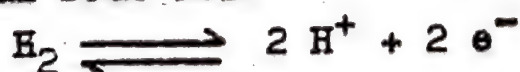
O constantă de echilibru poate desemna tendința unui agent reducător de a elibera electroni.

În sistemele biologice această tendință este denumită "potențial reducător standard" definit drept forța electromotrice (emf) în volți dată de o jumătate de celulă în care specia reductantă și oxidantă sînt ambele prezente în concentrații de cîte 1,0 M la 25°C și la pH 7,0 în echilibru cu un electrod care poate să accepte reversibil electroni de la specia reductantă după ecuația:



în care  $n$  reprezintă numărul de electroni transferați. (181)

Potențialul de reducere standard este o valoare a presiunii de electroni a unui cuplu oxidant-reductant, generată în echilibru în condiții specifice. Ca standard de referință se folosește potențialul reducător al reacției:



care convențional se aranjează la 0,0 volți în condițiile în care presiunea gazului de  $\text{H}_2$  este de 1,0 atm.

$[H^+]$  este 1,0 M, adică  $pH=0,0$  și temperatura este de  $25^{\circ}C$ .

Cînd această valoare este corectată la  $pH\ 7,0$   $[H^+] = 1 \times 10^{-7} M$ ,  $pH$ -ul de referință pentru toate calculele biochimice, potențialul standard de reducere al sistemului hidrogen-hidrogen ion, devine  $-0,42$  volți.

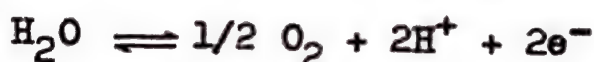
În tabelul care urmează sînt prezentate potențialele standard de reducere ale unor cupluri redox biologice. Datele sînt calculate pe baza transferului a 2 electroni la  $pH=7,0$  și  $T=25^{\circ}-37^{\circ}C$ .

<u>Reductant</u>	<u>Oxidant</u>	<u><math>E'_0</math> volți</u>
Acetaldehida	Acetat	$-0,60$
$H_2$ (electrod de hidrogen)	$2H^+$	$-0,42$
Izocitrat	alfa-cetoglu- tarat + $CO_2$	$-0,38$
$NADH + H^+$	$NAD^+$	$-0,32$
$NADPH + H^+$	$NADP^+$	$-0,32$
Succinat	Fumarat	$0,00$
Lactat	Piruvat	$-0,39$
Malat	Oxalacetat	$-0,16$
$NADH$ dehi- drogenaza (redușă)	(oxidată)	$-0,11$
Citocrom a (Fe II)	(Fe III)	$+0,29$
Citocrom b (Fe II)	(Fe III)	$0,00$



Citocrom c		
Fe (II)	Fe (III)	+0,26
H <sub>2</sub> O (electrod de hidrogen)	1/2 O <sub>2</sub>	+0,82
Glutation redus	Glutation oxidat	+0,04

Sistemele care au un potențial standard re - ducător mai negativ decât cuplul H<sub>2</sub>-2H<sup>+</sup> au o tendință mai mare de a pierde electroni decât hidrogenul; siste - mele cu un potențial standard reducător mai pozitiv au o o tendință mai mică de a pierde electronii decât acest cuplu. Cuplul apă-oxigen, cu ecuația:



are un potențial standard reducător de +0,815 volți, deci puternic pozitiv, prin urmare are o tendință ex - trem de mică de a pierde electroni și formează oxigen molecular.<sup>(171)</sup> Cu alte cuvinte, oxigenul molecular are o foarte mare afinitate pentru electroni, mult mai ma - re decât a unor acceptori de electroni ca NAD, flavo - proteine sau citocromii.

Ecuația Nernst, exprimă raportul dintre poten - țialul standard reducător a unui cuplu redox dat, a po - tențialului său observat și raportul concentrației do - norului de electroni și acceptorului de electroni după cum urmează:

$$E_h = E'_0 + \frac{2,303RT}{nF} \log \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

în care:

- $E_o$  potențialul standard reducător (pH=7,0  
T=25°C toate concentrațiile la 1,0 M)
- $E_h$  potențialul observat a electrodului
- R constanta gazelor (8,31 Jouli grade<sup>-1</sup>  
moli<sup>-1</sup>)
- T temperatura absolută
- n numărul electronilor transferați
- F Faraday (96406 Jouli volt<sup>-1</sup>)

La 25°C termenul  $2,303 RT/nF$  are valoarea 0,05 când n=1 și 0,03 când n=2.

Intrucât se obișnuiește să se calculeze echilibrele cuplurilor biologice redox în termenii transferului de 2 electroni, ecuația lui Nernst se simplifică la:

$$E_h = E_o' + 0,03 \log \frac{[\text{electron acceptor}]}{[\text{electron donor}]}$$

Potențialul standard reducător a diferitelor sisteme redox biologice facilitează postularea direcției fluxului de electroni de la un cuplu redox la altul, așa după cum potențialul de transfer de grupări fosfat permite postularea direcției, în care grupările fosfat vor fi transferate enzimatic.

Sursa principală de energie în marea majoritate a celulelor aerobe, este procesul de oxidare biologică, proces în care transportul de electroni este cuplat cu fosforilarea ADP. Esența acestui proces poate fi mai ușor înțeleasă dacă vom compara concepția actuală asupra oxidării biologice cu vechile concepții



asupra procesului de respirație celulară. Conform vechilor concepții, respirația celulară era considerată ca suma unui număr infinit de mare de reacții de oxidare a diferitelor substraturi; potrivit acestei concepții oxidarea fiecărui substrat își avea calea sa proprie. După noile concepții, oxidarea biologică se face printr-un număr restrâns de tipuri de reacții, oxidarea diferitelor substraturi având căi comune. Astfel, oxidarea finală a hidraților de carbon, grăsimilor și proteinelor se face pe căi comune. Aceasta înseamnă că pentru toate substraturile supuse oxidării biologice, oxidarea finală este identică.

Vechile concepții considerau că oxidarea biologică reprezintă o ardere de hidrați de carbon. După ce în 1780 Lavoisier observă că procesele oxidative din celula vie sînt identice cu arderea la flacără a substanțelor organice, s-a putut stabili că din punct de vedere energetic și termodinamic, oxidarea biologică și arderea la flacără pot fi similare. Căile celor două tipuri de oxidare sînt totuși fundamental diferite. În timp ce arderea la flacără reprezintă oxidarea carbonului la  $\text{CO}_2$ , aceasta eliberînd cantități însemnate de energie, oxidarea biologică reprezintă oxidarea ionului de hidrogen de către oxigen, reacție care de asemenea livrează energie. Oxidarea hidrogenului se face într-o succesiune de reacții, prin care hidrogenul luat de la substrat este transportat în vederea eliberării lui pentru oxidare.

Concepția veche considera respirația celulară o reacție

într-o singură etapă cu eliberare de căldură.

Conceptia modernă consideră oxidarea biologică un proces în mai multe etape, în care energia se eliberează treptat. De aici se vede că în celula vie, carbonul și hidrogenul sînt metabolizați pe căi diferite. Diferitele molecule de substanțe organice sînt metabolizate în final pe o cale comună pînă la  $\text{CO}_2$  în ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul Krebs). Eliberarea de energie se face în reacția de oxidare a hidrogenului similară reacției gazului detonant:



Oxidarea carbonului în  $\text{CO}_2$  în celula vie are loc fără modificări energetice semnificative.

Oxidarea hidrogenului care are loc în mai multe etape este cuplată cu un transfer de energie prin substanțe macroergice (ATP).

#### Enzime oxido-reducătoare participante în transferul de electroni.

Sînt cunoscute trei clase principale de enzime oxido-reducătoare care participă în transportul de electroni de la substratele organice la oxigenul molecular. În ordinea participării lor în lanțul respirator, acestea sînt:

- A. Dehidrogenaze piridin nucleotid -dependente
- B. Dehidrogenaze flavin nucleotid-dependente
- C. Citocromi



A. Dehidrogenaze piridin nucleotid-dependente.

Cu ocazia unui Congres dedicat dehidrogenazelor piridin nucleotid-dependente, care a avut loc la Konstantza (Germania) în 1969, H.Theorell arăta în concluziile finale ale congresului:

"Presupun că mulți dintre noi în aceste zile ne-am gândit la marele maestru german care ne-a deschis întregul câmp al enzimelor piridinice și flavinice, Otto Warburg!"

După ce în anul 1931 lui O.Warburg i s-a decernat premiul Nobel pentru descoperirea reacției chimice în care oxigenul molecular reacționează în lumea vie (reacția citocrom oxidazei) în anul 1944 pentru a doua oară i se acordă premiul Nobel, pentru descoperirea rolului nicotinamidei în transportul de hidrogen de către dehidrogenaze piridin nucleotid-dependente.

Așa cum arată în 1936 O.Warburg<sup>(172)</sup> drept coenzimă pentru dehidrogenaze pot servi cele două piridin nucleotide, NAD și NADP pe care inițial le-a numit difosfopiridin nucleotid (DPN) și respectiv trifosfopiridin nucleotid (TPN). Se poate considera astăzi că NAD este coenzima piridin nucleotidică implicată în special în procesele degradative în care hidrogenul substratului este introdus în lanțul respirator pentru oxidarea lui, în vederea acumulării de energie,<sup>(173,174)</sup> sub formă de ATP în timp ce NADP este forma coenzimatică implicată în special în căile metabolice reductive biosintetice.<sup>(175,176)</sup> Această separare nu este absolută,

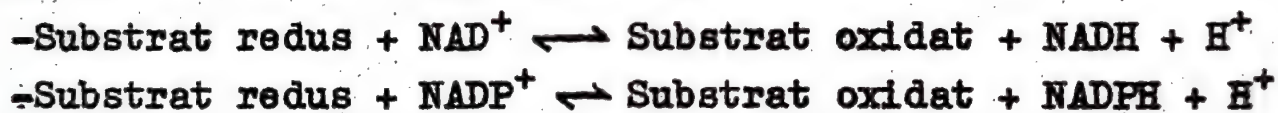
întrucît prin intermediul unei piridin nucleotid transhidrogenaze care catalizează reacția:



poate fi catalizat un proces de oxido-reducere între cele două piridin nucleotide.<sup>(177)</sup> Activitatea acestei transhidrogenaze explică formarea de ATP în timpul oxidării NADPH.<sup>(173,174,178)</sup>

Structura stereochemică, biosinteza, degradarea și principalele funcții metabolice ale NAD și NADP sînt descrise în Cursul de biochimie (Fasc.I)<sup>(179)</sup> apărut în 1974.

Piridin nucleotid dehidrogenazele catalizează următoarele tipuri de reacții:



NAD și NADP au fost găsite în toate tipurile de celule. Așa cum s-a mai arătat, în celulă, concentrația de NAD este mai mare decît cea de NADP. Peste 60% din NAD celular se găsește localizat în mitocondrii restul găsindu-se în citoplasma celulară. Aproape tot NADP se găsește în citoplasmă și numai urme găsim în mitocondrii.

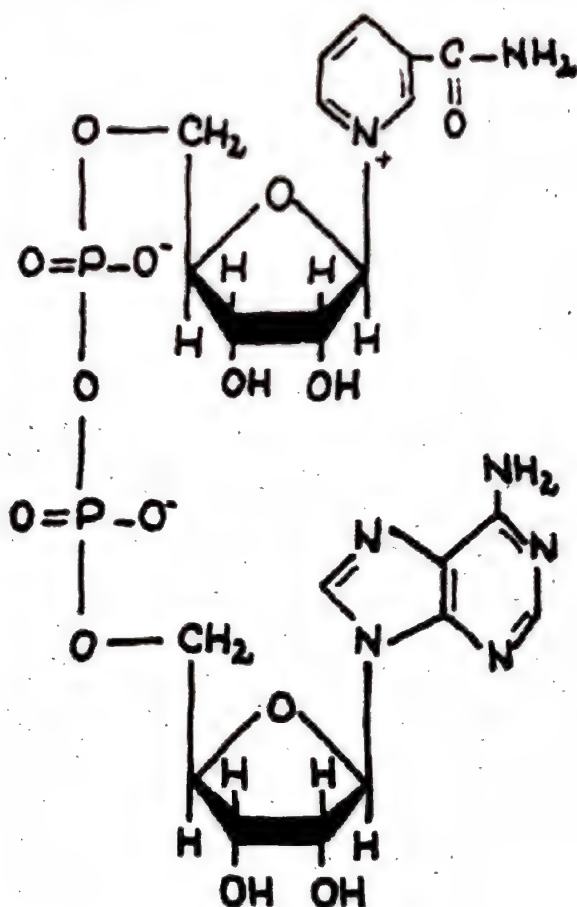
Dehidrogenazele NAD-dependente servesc în primul rînd în respirația celulară și participă în transferul de electroni de la substrat la oxigen, în timp ce NADP dehidrogenazele sînt implicate în transferul de electroni de la substratele generate în catabolism la



reacțiile reductive ale diferitelor procese biosintetice. NAD și NADP se leagă reversibil cu proteinele dehidrogenazelor în timpul ciclului catalitic. De aceea aceste două coenzime pot fi privite mai curînd ca substrat decît ca grupări prostetice ale dehidrogenazelor.

Nicotinamida este partea activă din structura NAD și NADP pe care se grezează hidrogenul acceptat de la substratul dehidrogenat.

#### Structura NAD



Dehidrogenazele piridin nucleotid - dependente pot fi împărțite în două grupe:

-Dehidrogenaze simple pentru care substratul oxidabil este un alcool, o amină primară, sau un semiacetal, iar produs al dehidrogenării este aldehida, cetona sau lactona corespunzătoare.

-Dehidrogenaze complexe care catalizează atât un proces de oxidare cât și de fosforilare. O astfel de enzimă este glicerin aldehid 3-fosfat dehidrogenaza.

În timpul procesului catalizat de piridin nucleotid dehidrogenaze, se formează un complex ternar între enzimă, coenzimă și substrat. Date experimentale arată că într-o primă fază a procesului catalitic se formează un complex enzimă-coenzimă.<sup>(240)</sup> Acest complex a fost demonstrat folosind metode de analiză ca: separarea ultracentrifugală și dializă; analiză spectrofotometrică a complexului enzimă-coenzimă; analiza fluorimetrică a complexului coenzimă redusă-enzimă; analiza dispersiei optice rotatorii.<sup>(180,240)</sup>

De pe urma acestor studii efectuate pe un număr însemnat de dehidrogenaze piridin nucleotid dependente ca malat dehidrogenaza,<sup>(182)</sup> lactat dehidrogenaza din inimă de bovină,<sup>(183,184)</sup> lactat dehidrogenaza din mușchiul scheletic,<sup>(185)</sup> alcool dehidrogenaza din ficat de cal<sup>(186,187,188)</sup> etc., s-a observat că pentru marea majoritate a acestor dehidrogenaze, o moleculă de NAD sau de NADH se leagă pe un fragment polipeptidic cu o greutate moleculară de 35000-40000. S-a mai stabilit că



NAD sau NADH ocupă acelaș loc pe molecula de enzimă. O remarcă interesantă a fost făcută și în privința conținutului metalic a multor dehidrogenaze piridin nucleotid dependente. În această privință s-a constatat că alcool dehidrogenaza conține Zn și anume la o greutate moleculară de 87000 enzima din ficatul de om<sup>(189, 190)</sup> conține doi atomi de Zn și două molecule de NAD. Glutamat dehidrogenaza din diferite țesuturi are deasemeni un conținut însemnat de ioni de Zn.<sup>(191, 192, 193, 194, 195)</sup>

Prezența ionului de  $Zn^{2+}$  a fost demonstrată și în structura alcool dehidrogenazei și din alte țesuturi arătându-se și modul de legare a ionului de  $Zn^{2+}$  cu molecula de proteină enzimă.<sup>(196, 197, 198)</sup>

Wallenfels<sup>(199, 200)</sup> și Mahler<sup>(201)</sup> arată că Zn din molecula de alcool dehidrogenază are un rol central în legarea substratului și al coenzimei. Ei apreciază că restul de adenină din structura NAD sau NADH, prin gruparea  $NH_2$  de la  $C_6$  se leagă cu ionul de  $Zn^{2+}$  din molecula de enzimă. Orto fenantrolina în competiție cu NAD sau NADH pentru ionul de  $Zn^{2+}$  inhibă activitatea alcool dehidrogenazei. Ioni de  $Zn^{2+}$  au fost identificați și în glicerin-aldehid-3-fosfat dehidrogenaza din mușchi de porc, enzimă NAD-dependentă care pentru o moleculă cu o greutate moleculară de 137000 conține 2 pînă la 3 atomi de Zn. Aceeași enzimă din mușchi de bovine și din drojdie conține deasemeni ioni de Zn.<sup>(202, 203, 204)</sup>

Malat dehidrogenaza din inimă de bovine care are greutatea moleculară de 40000 are în structură o moleculă

de NAD și un atom de Zn.<sup>(205)</sup>

Se presupune că ionul de Zn din structura dehidrogenazelor amintite leagă NAD sau NADP de proteina enzimă.

Grupările sulfhidrilice (SH) par să fie esențiale în activitatea catalitică a acestor enzime. Astfel s-a putut demonstra că para-hidroximercuribenzoatul (PHMB) și iod acetatul (IA), para-clormercuribenzoatul (PCMB) și ionii metalelor grele inhibă activitatea alcool dehidrogenazei din drojdie.<sup>(206,207,208)</sup>

Există o proporționalitate directă între scăderea numărului de -SH libere și scăderea cantității de coenzimă legată de enzimă.<sup>(200,208,209)</sup> Coenzima protejează grupările sulfhidrilice de carboximetilare.<sup>(210)</sup>

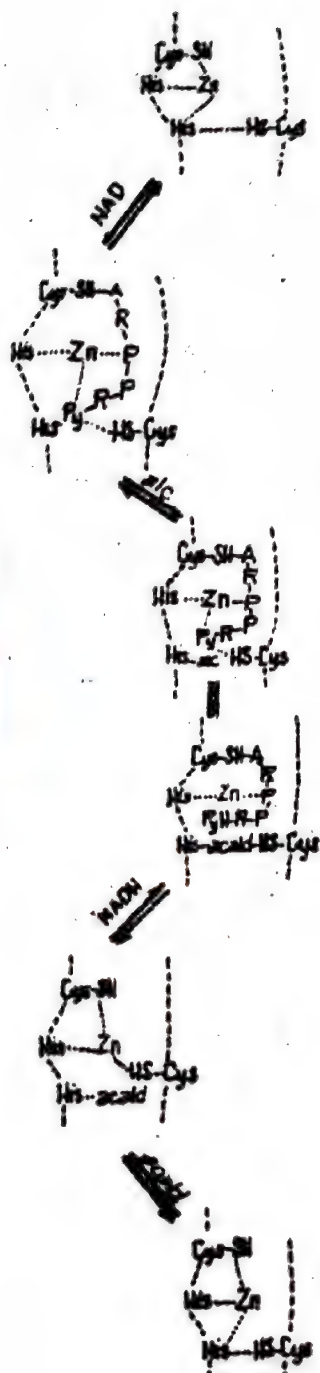
Wallenfels<sup>(211)</sup> arată că ionii de Zn se leagă de molecula de alcool dehidrogenaza din drojdie, pe de o parte prin grupările sulfhidrilice, iar pe de altă parte printr-un rest de histidină.

Keleti<sup>(212)</sup> dă următoarea secvență reacțională pentru alcool dehidrogenaza din drojdie; schemă redată pe pagina următoare.

După cum se vede din schemă prima etapă din activitatea acestei enzime, este legarea de coenzimă. Nucleul de piridină al coenzimei se leagă de ionul de Zn, iar nucleul de adenină se leagă de enzimă printr-o grupare sulfhidrilică.<sup>(213,214,201)</sup> Substratul la această enzimă se leagă de restul de histidină din centrul activ al enzimei.<sup>(214)</sup>

Din această schemă se vede că grupările sulfhidrilice di





centrul activ al enzimei, participă în legarea Zn și în legarea coenzimei.

Prezența Zn și a grupărilor -SH a fost demonstrată pentru toate dehidrogenazele piridin nucleotid dependente. La fel a fost demonstrată în participarea enzimatică a unui rest de histidină esențial.

Si pentru lactat dehidrogenază-enzimă deasemeni NAD dependentă pentru care mult timp prezența Zn în molecula de enzimă a fost controversată, s-a putut stabili după atacarea moleculei de enzimă cu uree, prezența acestui ion metalic. (215)

Sînt cunoscute circa 200 dehidrogenaze piridin nucleotid dependente care pot deci livra hidrogeni lanțului respirator.

NADH - dehidrogenaza lanțului respirator.

NADH-dehidrogenaza lanțului respirator leagă oxidarea NADH generat metabolic în sistemul terminal de transport de electroni. Porțiunea activă a acestor enzime este reprezentată prin molecula de flavin nucleotid din complexul flavoproteinic enzimatic. Acest complex flavoproteinic poate fi izolat în diferite forme active cu proprietăți moleculare și catalitice diferite.

Se pare că NADH-dehidrogenaza catalizează transferul de electroni la un acceptor încă insuficient cunoscut, probabil o proteină Fe-neheminic care se găsește în lanțul respirator.

Preparatele de NADH-dehidrogenaze din lanțul respirator se obțin în diferite forme moleculare. Sînt descrise trei categorii de NADH-dehidrogenaze:

- NADH dehidrogenaze legate de structura mitocondrială, ca de ex. Complexul I a lui Hatefi<sup>(216)</sup> care este solubil și care conține o fracțiune enzimatică cu greutate moleculară mare și una cu greutate moleculară mică. Fracțiunea cu greutate moleculară mare conține aproape în totalitate activitate NADH dehidrogenazică din membrana mitocondrială. Are un conținut bogat în lipide, conține coenzima Q<sub>10</sub> și o structură proteinică separată de cea proteinică propriu zisă.<sup>(216,217)</sup>

- NADH dehidrogenaze care pînă acum au fost obținute numai prin extracție cu fosfolipază A la temperatura de 30°C. Enzima solubilă astfel obținută, este sta-



bilă. Din punct de vedere al proprietăților, acest tip de dehidrogenaze seamănă mult cu NADH dehidrogenazele descrise mai sus. Astfel în aceste două tipuri de dehidrogenaze se găsește un raport Fe-neheminic/FMN de 16-18 și un raport Sulf labil/FMN de circa 27. Porțiunea Fe - Sulf arată o valoare a semnalului  $g = 1,94$  dacă este redusă de către substrat în cazul măsurării rezonanței electronice paramagnetice de spin. Specificitatea de substrat este aceeași pentru ambele dehidrogenaze, reacționează puternic cu fericianura, iar cinetica reducerii cu fericianură este similară cu aceea observată în preparatele membranare, arătând de asemeni o foarte mică reactivitate cu oxigenul, cu citocromul c și cu diverși coloranți (activitate diaforazică).<sup>(217,218,219,220)</sup>

Deosebirea dintre proprietățile catalitice ale acestei ultime NADH dehidrogenaze și Complexul I constă în prezența numai în complexul I a unei activități coenzimă Q reductazică sensibilă la rotenonă și amital.

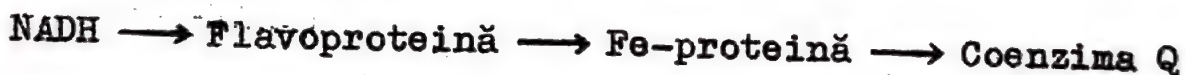
În complexul I găsim o serie de fosfolipide absente în enzima solubilă, obținută sub acțiunea fosfolipazei A. Aceste fosfolipide sînt indispensabile în activitatea enzimei cu coenzima Q adăugată din afară, sistemului.

- NADH dehidrogenaze cu greutate moleculară mare, obținute din porțiunea particulată (structurală) mitocondrială sub influența unor agenți ca: enzime proteolitice, uree, tiouree, căldură, sau asociind căldură, pH acid și etanol. Astfel de dehidrogenaze au fost izolate din mitocondriile de inimă.<sup>(221,222,223,224)</sup>

Toate preparatele obținute prin căldură în mediu acid și cu etanol, au o greutate moleculară de circa 30000, iar raportul Fe/FMN și S/FMN este foarte mic, de circa 2 - 4. Semnalul de rezonanță electronică paramagnetică indus de substrat lipsește.

În ceea ce privește originea și semnificația diferitelor forme moleculare de NADH dehidrogenaze, se poate considera că forma cu o greutate moleculară mare, este un complex multienzimatic, care sub influența diferiților agenți enzimatici, chimici, sau fizici, poate disocia în componentele enzimatic individuale ale acestuia. (225)

Hatefi (220, 226) consideră NADH dehidrogenaza drept un complex multienzimatic format dintr-o flavoproteină și Fe,-S-proteină. În acest complex multienzimatic secvența transportului de electroni, este postulată în modul următor:



Tratarea complexului I cu uree duce la scindarea NADH dehidrogenazei în fragmente cu greutate moleculară mică și cu activitate asemănătoare citocrom reductazei. Alături de aceste fragmente au fost de asemenea izolate, altele tot cu greutate moleculară mică - flavoproteine - conținând FMN, Fe, și S labil în raport 1:4:4 cu proprietăți foarte asemănătoare acelor descrise pentru NADH citocrom reductaze.

Au mai fost izolate și fragmente polipeptidice



conținând cantități egale de Fe și S însă fără conținut flavinic. Flavoproteina a fost decolorată de către NADH după cum s-a și presupus, iar Fe-proteina a fost numai foarte puțin decolorată de către NADH. În schimb, în prezența flavoproteinei s-a observat o decolorare rapidă a Fe-proteinei de către NADH.<sup>(226,228,227)</sup>

În 1955 Ernster<sup>(229)</sup> descoperă efectul inhibitor selectiv al amitalului asupra oxidărilor mitocondriale pentru substrate NAD-dependente. Ulterior, amitalul și alte barbiturice ca rotenona și piericidina A au fost larg folosite ca inhibitori ai oxidării NADH.

Studii efectuate cu inhibitori marcați cu  $^{14}\text{C}$  au arătat că toate aceste trei clase de inhibitori, reacționează la același loc din structura NADH oxidazei și că piericidina A este cel mai eficient și specific, chiar la concentrații foarte mici.

În 1956 B.Chance<sup>(230)</sup> arată că amitalul și alte barbiturice întrerup transportul de electroni în mitocondrii la etapa dintre NADH și flavoproteine. Studiile spectrofotometrice au confirmat justetea acestui postulat în cazul rotenonei.<sup>(231,232)</sup>

Hatefi<sup>(220)</sup> măsurând efectul rotenonei, piericidinei A și barbituricilor asupra modificărilor absorbției la 460 nm și la 510 nm observă că rotenona și piericidina produc o inhibiție de 50% în valoarea reducerii de la 460 nm în timp ce amitalul are un efect mai slab. Modificările de absorbție observate au fost atribuite Fe neheminic din structura unor proteine ce conțin această

formă de Fe și interpretate în sensul ipotezei că în complexul I există separat o flavoproteină și o proteină cu Fe neheminic. Pe baza acestor date s-a considerat că inhibitorii studiați acționează între aceste două unități funcționale în complexul NADH dehidrogenază din lanțul respirator. Aceste observații nu exclud însă posibilitatea că în preparatele investigate, prezența citocromilor să influențeze modificările de absorbție observate la 460 nm în prezența inhibitorilor studiați.

Pe preparatele de membrană mitocondrială care conțin lanțul respirator complet, piericidina și rotenona au două locuri de legare specifice, ambele implicate în procesul de inhibiție și în plus un loc nespecific de legare care poate contribui la inhibiție, la concentrații foarte mici de inhibitor. Inhibiția NADH coenzima Q reductazei pare să implice numai locurile de legare specifice. (225)

Se poate presupune astăzi că pentru activitatea NADH dehidrogenazelor sînt esențiale atât componenta proteică, cît și componenta lipidică a acestora, implicate în structura locurilor de legare specifice, responsabile pentru interacțiunea dintre componenta flavoproteinică și coenzima Q.

S-a demonstrat (227) că NADH dehidrogenaza în inimă și ficat, înainte de a suferi modificări de pe urma procesului preparativ de laborator, are o foarte mică reactivitate față de citocromul c, 2,6 diclorfenolindofenol, menadiona, și coenzima Q, dar că reacționează foarte rapid



cu fericianura.

Există date care arată că în mitocondriile de inimă, de fapt nu se găsesc în stare nativă decât două enzime ce pot oxida NADH și anume:

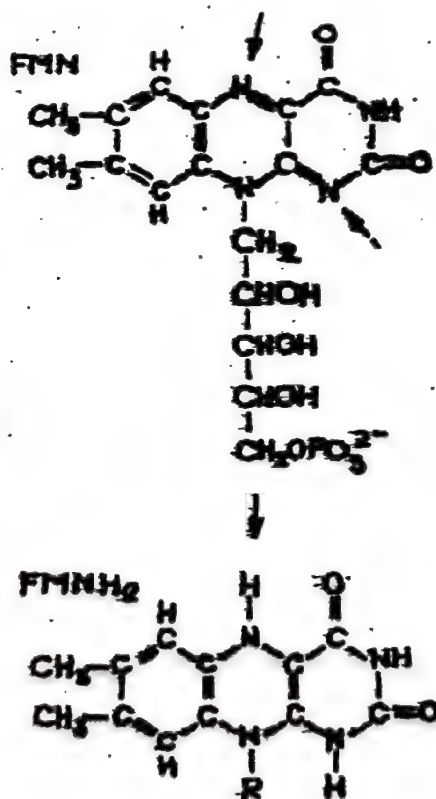
- NADH dehidrogenaza lanțului respirator și
- Lipoil dehidrogenaza, enzimă care de fapt nu are relații directe cu lanțul respirator transportor de electroni și care are de fapt funcția de a reduce NAD și nu de a oxida NADH. (233)

Un criteriu de funcționalitate al complexului NADH dehidrogenazic, așa cum am mai arătat este păstrarea semnalului de rezonanță electronică paranucleară datorat conținutului în Fe al enzimei. Dispariția acestui semnal, înseamnă pierderea Fe, a porțiunii din structura proteinică a enzimei ce conține Fe, pierdere care se observă în tratamentul cu uree, tiouree, enzime proteolitice, în tratamentul cu căldură-acid-etanol al preparatului mitocondrial în procesul, sau mai bine zis în tentativa de izolare a NADH dehidrogenazei.

Aceste tratamente duc la transformări moleculare importante a NADH dehidrogenazei, complex enzimatic labil. De pe urma acestor transformări, prin labilizarea porțiunii flavinice, duce la creșterea reactivității cu citocromul c și cu diclorfenolindofenolul (DCPIP). Ori se știe că una din proprietățile fundamentale ale flavinelor libere este oxidarea lor rapidă cu citocromul c și DCPIP. (234, 235) În flavoproteine, ca în NADH dehidrogenaza, factorii structurali nu permit aceste interacțiuni.

Datele obținute cu privire la apariția activității NADH citocrom reductazei după depolimerizarea NADH dehidrogenazei mitocondriale nu exclud total și posibilitatea existenței unei astfel de activități enzimice independent de lanțul respirator, asemănătoare NADH și NADPH citocrom reductazei din microzomi și citoplasmă sau aceluiași enzime din surse microbiene<sup>(225)</sup>

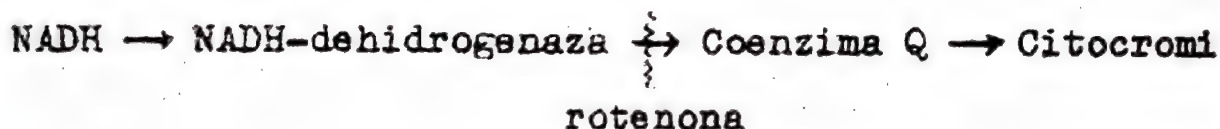
NADH dehidrogenaza se pare că are un conținut în FMN de circa 1 mol.FMN pe circa  $8 - 10 \times 10^5$  g proteină și numai urme de FAD. În unele preparate FAD lipsește complet<sup>(225)</sup> Acceptarea de hidrogeni sub acțiunea NADH dehidrogenazei se face pe moleculă de iscoaloxazină al FMN după schema:





După cum am mai arătat, NADH dehidrogenaza denumită și NADH ubiquinon reductaza, din mitocondrii este o enzimă fosfolipid dependentă,<sup>(236,237)</sup> și este complet inhibată de rotenonă și amital.

Rotenona și barbituricele întrerup transportul de electroni pe latura dinspre substrat a coenzimei Q întrucât acestea inhibă reducerea coenzimei Q dar nu și reoxidarea acesteia. Schema dată de Horgan și Singer<sup>(238)</sup> ilustrează convingător acest efect:



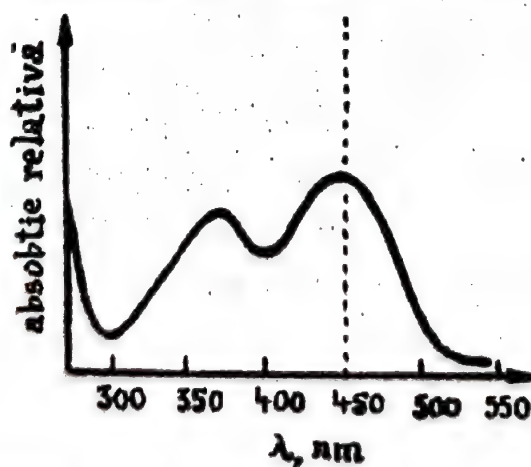
Legarea rotenonei la locul specific de legare de pe enzimă nu este ireversibilă așa cum a arătat Ernster<sup>(232)</sup> și Horgan<sup>(239)</sup> întrucât după șase spălări ale enzimei maximal inhibate cu rotenonă, în soluție de 2% serumalbumină bovină, inhibiția oxidării NADH scade cu 62%

Cremona<sup>(219)</sup> pe bază de calcul ajunge la concluzia că particulele transportoare de electroni (ETP) au un conținut în NADH dehidrogenaza de aprox. 40m/u mol pe gram. Concentrația de rotenonă care se leagă la locul specific al moleculei de enzimă este de acelaș ordin de mărime cu conținutul de NADH dehidrogenază.

Este de menționat că deși în procesul de oxidare sau de reducere a grupărilor prostetice FMN sau FAD din structura flavindehidrogenazelor, se prezintă

formal ca o reacție implicând un transfer simultan de doi atomi de hidrogen sau de doi electroni, există date care arată că aceste reacții au loc în etape separate și succesive de transport de câte un electron. Transportul unui singur electron pe structura FMN din structura NADH-dehidrogenazei duce la formarea semichinonei FMN, radical liber care conține un electron nepereche și care poate fi detectat prin spectroscopie de rezonanță electronică paramagnetică de spin, metodă cu ajutorul căreia se pot detecta moleculele cu un spin electronic nepereche, după comportamentul în câmp magnetic.

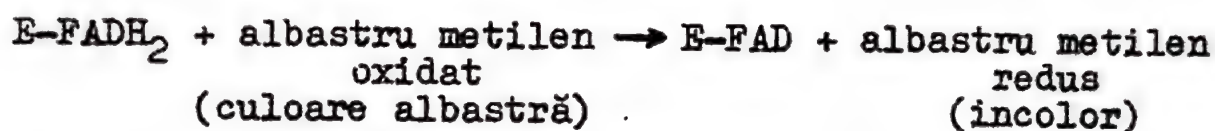
NADH-dehidrogenazele care sînt enzime flavinice sînt intens colorate și pot fi roșii, brune sau verzi avînd un peak de absorbție în jur de 370 nm și un altul în jur de 450 nm. Dacă enzimele sînt reduse enzimatic sau chimic, acestea se decolorează nemaiprezentînd absorbție la 450 nm.



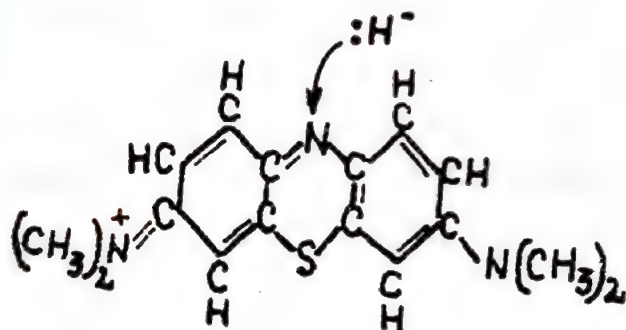
Spectrul de absorbție al formei oxidate  
a flavin dehidrogenazelor



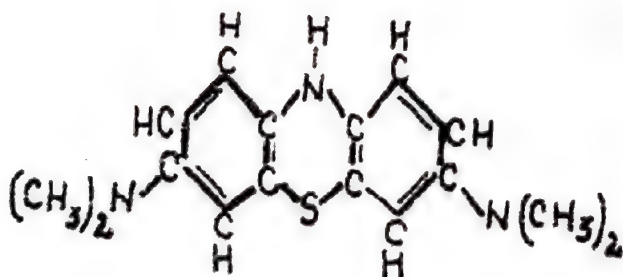
Flavin dehidrogenazele reduse sînt ușor oxidate de către acceptori de electroni artificiali, ca fericianura sau de către coloranți reducători, albastru de metilen, fenazin-metosulfat, 2,6-diclorfenolindofenol (DCPIP). Acceptori artificiali de electroni care acționează după schema:



sînt folosiți larg în diferite metode colorimetrice de dozare a dehidrogenazelor flavin-dependente.

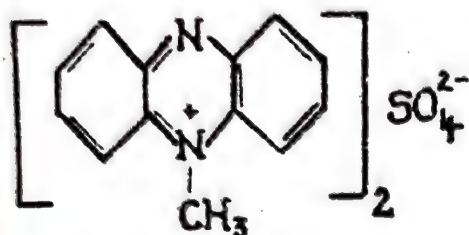


Forma oxidată  
(albastră)

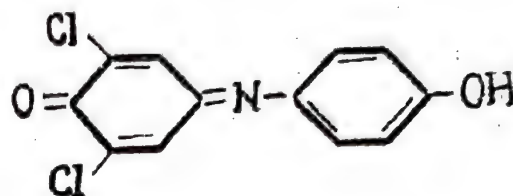


Forma redusă  
(leuco)-incoloră

În același mod reacționează și fenazin-metosulfat și 2,6-diclorfenolindofenol:



Fenazin-metosulfat



2,6-Diclorfenolindofenol

### Proteine cu fer-neheminic din mitocondrie

Sistemul de transport de electroni mitocondrial implică două clase de compuși ce conțin fer și anume: citocromii și proteinele cu fer neheminic (non-haem proteins). Fer sub formă de depozit ca -feritina- de asemeni poate fi găsit în mitocondrii.

Enzima -ferochelataza- care participă în inserția ferului în porfirine este localizată pe fața internă a membranei interne mitocondriale <sup>(263)</sup> și folosește ioni de fer numai în forma redusă. <sup>(264)</sup>

Și aconitaza, o enzimă a ciclului Krebs, necesită tot fer pentru activitate <sup>(265)</sup> și, ca și ferochelataza este situată în interiorul matricei mitocondriale.

Date experimentale arată că reducerea ferului feric și a complexelor acestuia, are loc pe fața internă a membranei mitocondriale interne în apropierea ferochelatazei. Reducerea se face fie cu flavoproteine, fie cu ajutorul succinat dehidrogenazei, fie cu ajutorul NADH-dehidrogenazei. <sup>(266)</sup>



Proteinele cu fer neheminic sînt în general legate de NADH-dehidrogenaza din lanțul respirator, au o greutate moleculară între 6000 și 12000, și izolarea și purificarea lor este posibilă. Nu este încă suficient de clar rolul acestor proteine cu fer neheminic în transportul de electroni și dacă acestea constituie unități moleculare independente, sau sînt subunități ale dehidrogenazelor flavin-dependente.

Proteinele cu fer neheminic conțin 2-8 atomi de fer pe moleculă și un număr echivalent de resturi de cisteină, la care fierul este legat prin legături insuficient clarificate. Tratatamentul proteinelor cu fer neheminic, cu acizi, duce la eliberarea sulfurii sub formă de  $H_2S$ . Aceste proteine pot fi reduse chimic sau enzimatic, dar nu se știe exact cum are loc acest proces. De obicei, reducerea acestor proteine, este o fază cu un electron și este asociată cu o îngrîsire a formei oxidate care este de culoare roșie sau roz. Această reducere duce la apariția unui peak la 450 nm și a unui semnal caracteristic de rezonanță electronică paramagnetică de spin.

Proteine cu fer neheminic participă activ în procesul de fotosinteză și în procesul de fixare de azot.

Comparînd viteza de reducere a  $Fe^{3+}$  de către mitocondriile întregi de ficat de șobolan, cu aceea a mitocondriilor tratate cu ultrasunete, se vede că reducerea fierului are loc în interiorul mitocondriilor și lipsește în fracțiunea matricială solubilă, arătînd

deci că reducerea ferului este o proprietate a feței interne a membranei mitocondriale. (266)

Compușii cu fer sînt reduși de către lanțul respirator și nu printr-un mecanism independent. Se consideră că există cel puțin două locuri de reducere a ferului și anume:

- un loc între succinat și locul de blocare cu antimicină A,

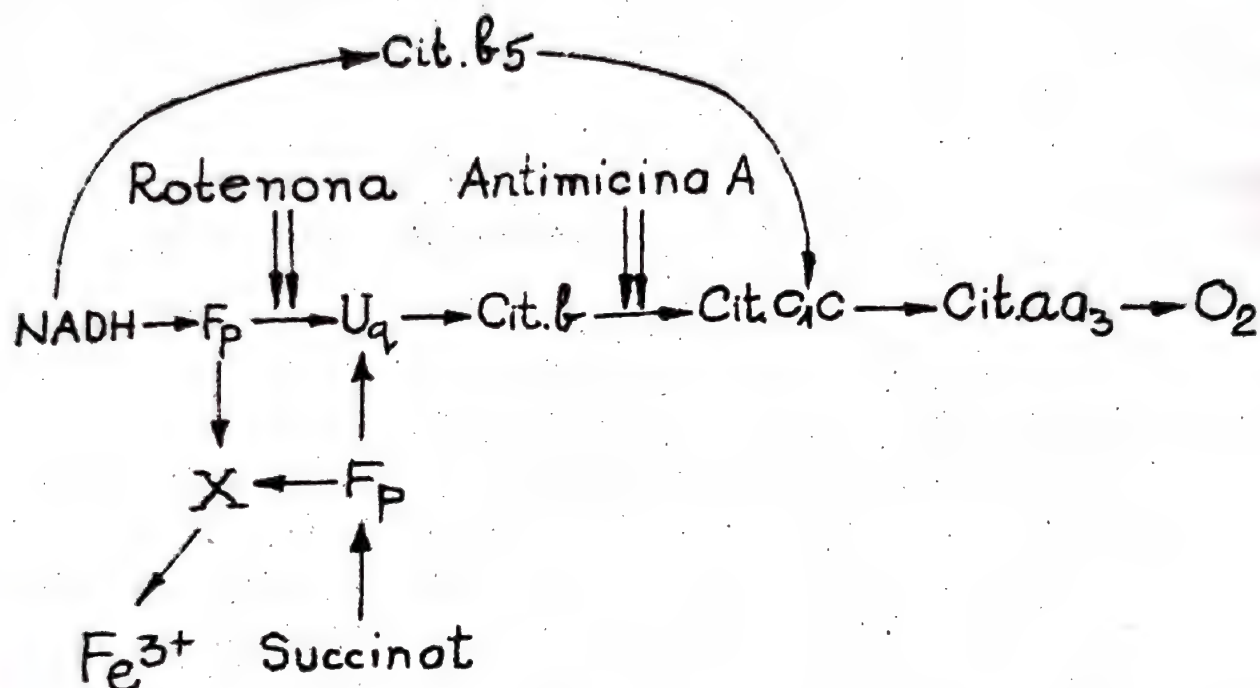
- un loc între NADH și locul de blocare cu rotenonă.

Dacă lanțul respirator este întrerupt cu un inhibitor se vede că adăugarea de  $\text{Fe}^{3+}$  la particulele mitocondriale anaerobe este urmată de o oxidare a citocromului b.

Locul de interacțiune între  $\text{Fe}^{3+}$  și lanțul respirator este flavoproteina NADH-dehidrogenaza și succinat-dehidrogenaza.

Din schema (266) care urmează se vede că în mitocondriile tratate cu ultrasunete, transportul de electroni de la NADH și succinat poate să fie localizat fie în întregime pe fața internă a membranei interne și în acest caz este inhibat cu rotenonă și antimicină A, fie într-un sistem în care prin intermediul citocromului  $b_5$  de pe fața externă, oxidarea NADH ocolește fazele inhibiției cu rotenonă și antimicină A și deci este insensibilă la acești doi inhibitori.





Transportul de electroni de la NADH și succinat în mitocondrii după tratament cu ultrasunete.

X = intermediar neidentificat  
 Uq = ubiquinona  
 F<sub>p</sub> = flavoproteină

Din tabelul care urmează se vede că numai un număr restrâns de compuși cu fer pot traversa membrana mitocondrială pînă la locul de reducere a ferului.

Disponibilitatea ferului din diferite complexe pentru reducerea de către mitocondriile de ficat de șobolan intacte sau tratate cu ultrasunete sau pentru activitatea ferochelatazei din mitocondriile tratate cu ultrasunete.

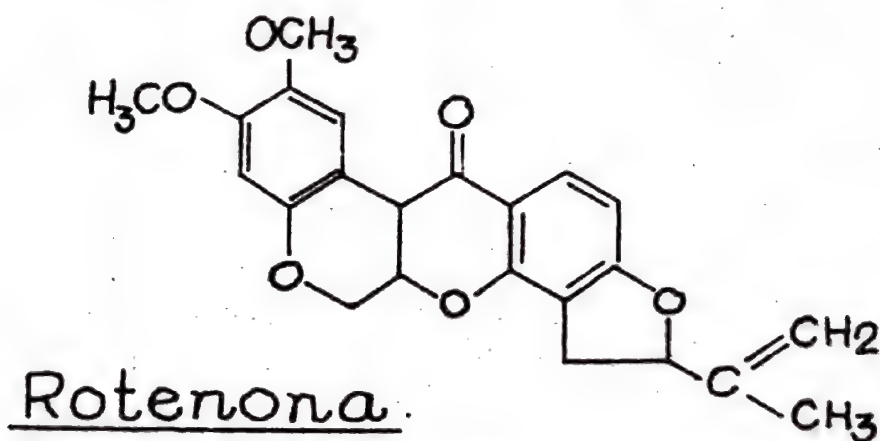
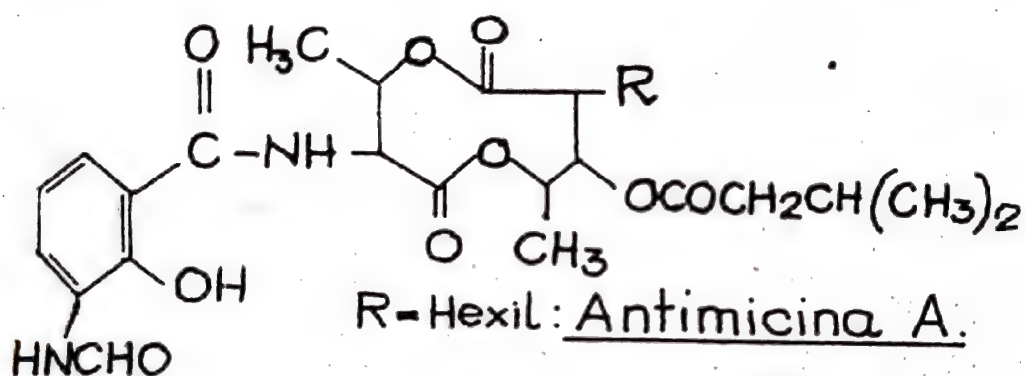
(Reducerea ferului măsurată prin consumul de oxigen. Activitatea ferochelatazei dată în nmoli hem-deuteriu/min./mg proteină).

Compusul cu Fe	Consumul de $O_2$ în mitocondrii <sup>2</sup>		Activitate ferochelatazică
	Intacte	+ ultrasunete	
$FeCl_3$	urme	+++	0,7
Ferioxamină G	+++	+++	0,5
Ferioxamină B	urme	+	0,5
Ferioxamină D	-	-	-
Ferirubină	-	urme	-
Fericrom	-	-	-
Fericrom A	-	-	-
Fericrisin	-	-	-
Ferocen	-	-	-
Imferon	-	-	urme
Transferină	-	-	-
Feritină	-	-	-
Feredoxină	-	-	-

+ = circa 15 ng atom  $O/min./mg$  proteină  
 +++ = circa 50 ng atom  $O/min./mg$  proteină

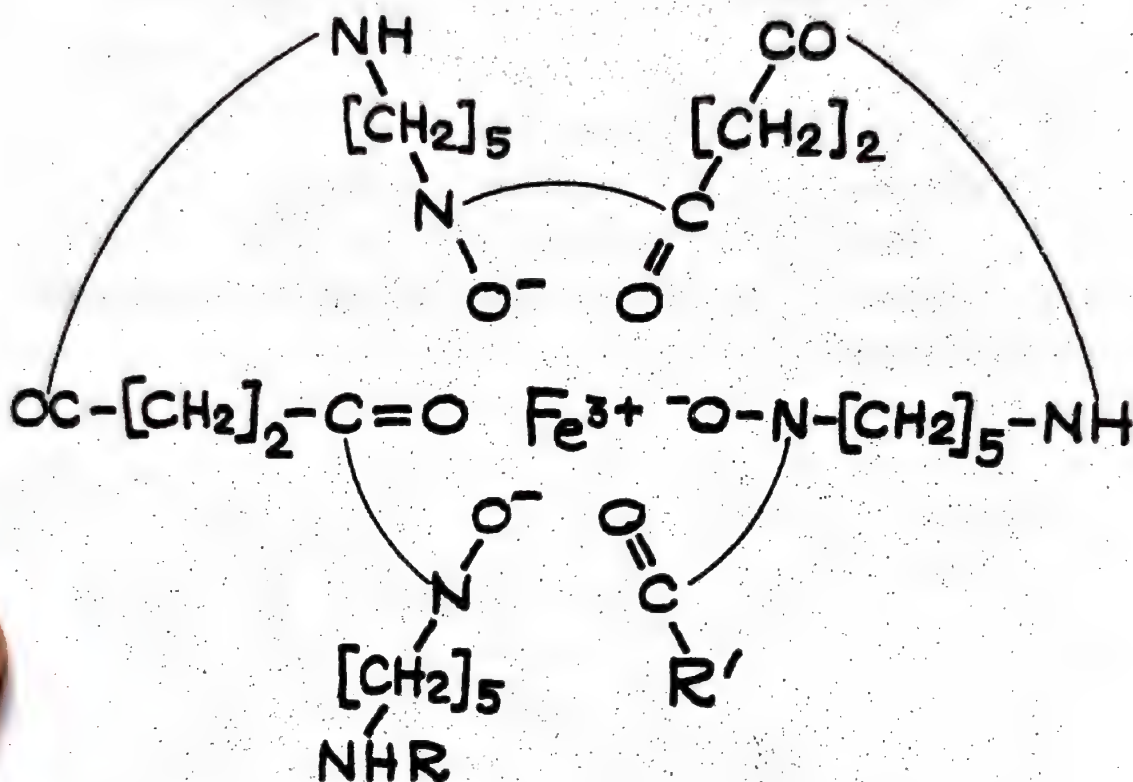


Se vede că numai ferrioxamina G și mai puțin ferrioxamina B pot fi reduse în mitocondrii, sau de către particulele mitocondriale, în timp ce ceilalți transportori de fer microbieni sau complexe cu fer ca: transferina și feritina de la mamifere sînt insuficiente. Reducerea ferrioxaminei G și B nu este inhibată cu rotenonă și antimicina A, la fel nu este inhibată nici reducerea  $\text{FeCl}_3$ .

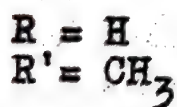


Aceasta arată că  $\text{Fe}^{3+}$  este redus primar de citocromul b, oxidarea căruia nu este sensibilă la antimicina A și rotenona, așa cum am arătat mai înainte.

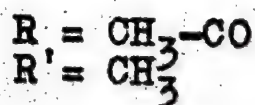
Redăm mai jos structura ferioxaminelor (G,B,D):



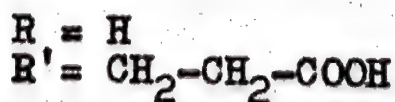
Ferioxamina B



Ferioxamina D<sub>1</sub>



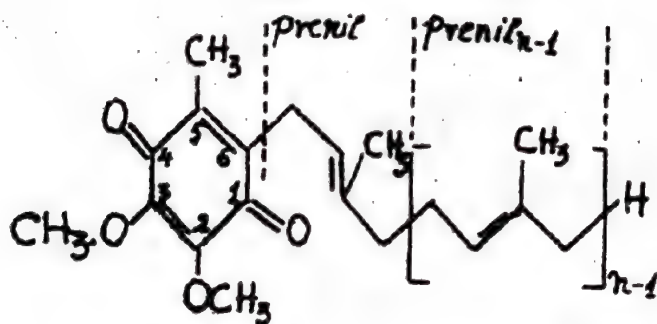
Ferioxamina G





### Coenzima Q și lanțul respirator

În legătură cu transportul de electroni prin lanțul respirator un interes deosebit prezintă coenzima Q sau ubiquinona, găsită în toate celulele și izolată pentru prima dată în Anglia de Morton.<sup>(278,279)</sup> Din punct de vedere chimic, ubiquinona este 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona:



### Ubiquinona

Mai importante sînt două forme de ubiquinone și anume: coenzima  $Q_6$  și Coenzima  $Q_{10}$  ( $CoQ_{10}$ ). Coenzima  $Q_{10}$  este un derivat de benzoquinonă cu o catenă laterală izoprenoidă lungă, pe care o găsim în special în celulele animale. Această formă conține 10 resturi de izopren (prenil). În celelalte organisme, se găsesc coenzima  $Q_6$

și coenzima  $Q_8$  cu 6 și respectiv cu 8 resturi de izopren.

Coenzima  $Q_{10}$  mai poartă denumirea și de ubiquinona-50 întrucât cele 10 resturi izoprenoide care constituie catena laterală conțin 50 de atomi de carbon.

Coenzima  $Q_6$  poartă denumirea de ubiquinonă - 30 deoarece catena laterală izoprenoidă este formată din 30 de atomi de carbon.

Studiind proprietățile fizico-chimice ale diferiților derivați de ubiquinonă, Pennock și Morton<sup>(280)</sup> arată că ubiquinona-50 are greutatea moleculară = 863 un procent de grupări metoxi de 7,19, punctul de topire  $48,5^{\circ}\text{C}$  și  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  la 272 nm = 167. Ubiquinona-40 are gr. molec. = 727, grupări metoxi 8,53%, punct de topire la  $37^{\circ}\text{C}$  și  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  la 272 nm = 206. Ubiquinona-30 are gr. moleculară = 591, grupări metoxi 10,5%, punct de topire  $19,2^{\circ}\text{C}$  și  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  la 272 nm = 246.

Analizând conținutul în ubiquinonă în diferite organe, la pește, s-a constatat la cod, un conținut mai mare de ubiquinonă în inimă ( $49, \mu\text{g/g}$ ), mai mic în ficat ( $2,6, \mu\text{g/g}$ ) și foarte mic în mușchi ( $0,24, \mu\text{g/g}$ ). Spectrul în infraroșu al ubiquinonei din inimă de cod, este identic cu acela al ubiquinonei-50 din inimă de cobai.<sup>(280)</sup>

Examinând conținutul în ubiquinonă al inimii la diferite specii de mamifere, s-a ajuns la concluzia că importante cantități de ubiquinonă sunt conținute



endogen în cord și că odată cu creșterea gradului de dezvoltare evoluționară biologică, se constată și o creștere a conținutului endogen în ubiquinonă a cordului. <sup>(281)</sup>

Astfel la insectivore ca erinaceide, conținutul în ubiquinonă în inimă este de 23,5-108, ug/g țesut umed, în ficat 12-19, ug/g, în intestin 25,3, ug/g țesut umed, la rozătoare (șobolan): în inimă 199,3, ug/g țesut umed, în ficat 77, ug/g țesut umed, în intestin 63,7, ug/g țesut umed, iar la carnivore (vulpe) în inimă 240,6, ug/g țesut umed, în ficat 86,3, ug/g țesut umed, în intestin 24,3, ug/g <sup>(281)</sup>.

Și la păsări există variații în conținutul în ubiquinonă a diferitelor organe. Astfel, din tabelul de mai jos se vede bine acest lucru:

Conținutul în ubiquinonă la păsări

	ug/g țesut umed		
	Inimă	Ficat	Intestin
Găină domestică	18,0	13,0	1,4
Porumbel	174,5	31,3	317,8
Canar	242,3	52,0	38,0

Este posibil ca întregul conținut al țesuturilor în ubiquinonă să fie folosit pentru respirația

- 85 -

celulară. În principiu, se știe că mitocondriile din diferite țesuturi au o compoziție și funcții similare, de aceea diferențe cantitative în CoQ al țesuturilor ar putea fi puse pe seama numărului de mitocondrii. Un astfel de raport este util în interpretarea funcției ubiquinonei.

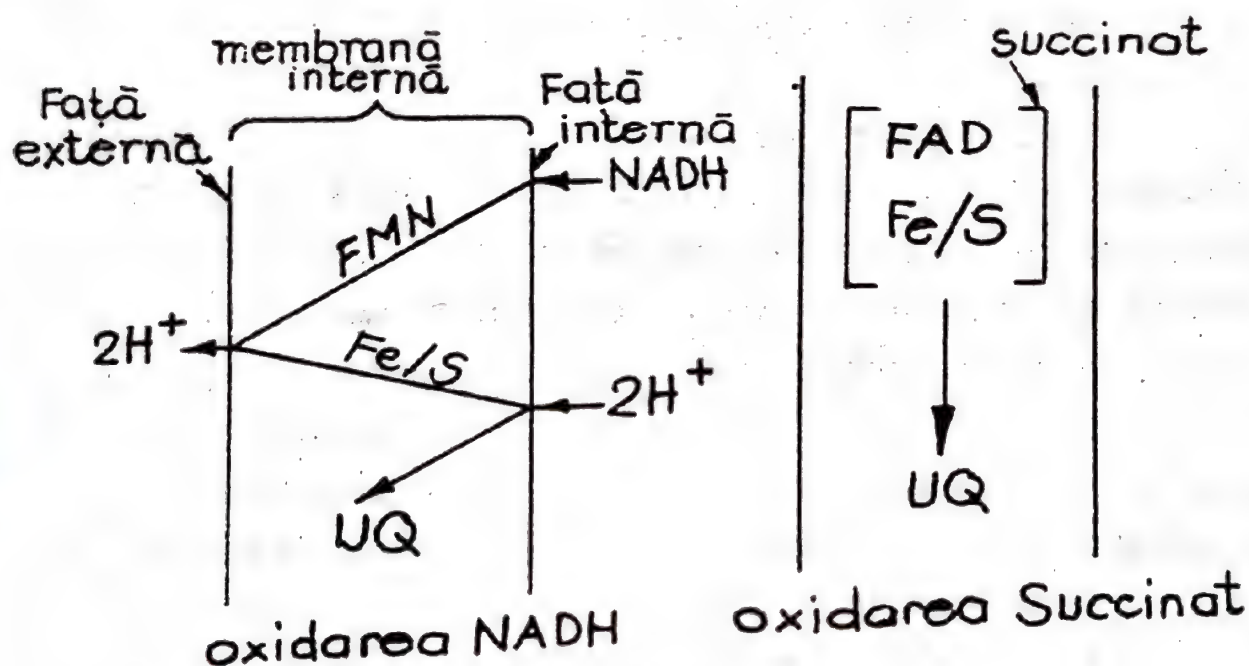
Sînt date care arată că conținutul în CoQ al mitocondriilor în unele țesuturi la mamifere este în exces, și de aceea se poate pune și problema unor alte funcții a ubiquinonei în afară decît aceea de transportor de electroni. Dacă CoQ și citocromul c sînt folosite în transportul de electroni pe bază echimolară, necesarul de ubiquinonă poate fi ușor calculat. De obicei însă, conținutul în ubiquinonă depășește conținutul în citocrom c, compus exclusiv mitochondrial<sup>(281, 282, 283)</sup> și de aici, posibilitatea ca CoQ să aibă și alte funcții în afara aceleia de transportor de electroni.

Ubiquinona se găsește în celulele vertebratelor, nevertebratelor, plantelor superioare, algelor și într-un număr mare de bacterii și microorganisme.<sup>(281, 284, 285, 286)</sup> Rolul acestui compus rămîne încă insuficient clarificat.

Încă în 1967, Krüger și Klingenberg<sup>(287)</sup> arată că ubiquinona-10 este un transportor respirator comun pentru oxidarea atît a NADH cît și a succinatului, și că sinteza de 1 mol. ATP din ADP și  $P_a$  este cuplată cu reducerea a 1 mol de ubiquinonă -10 de către NADH dar nu și de succinat.



Lawford<sup>(288)</sup> arată că ubiquinona-10 acționează ca acceptor pentru complexul Fe-S-flavoproteinic al NADH dehidrogenazei și succinat dehidrogenazei după schema:



FMN = gruparea prostetică a NADH dehidrogenazei

FAD = gruparea prostetică a succinat oxidazei

Fe/S = fier - sulf - proteină

UQ = ubiquinona

Pe baza studiilor experimentale, se poate afirma că activitatea NADH ubiquinon reductază sensibilă la rotenonă poate fi organizată în lanțul respirator ca etapă oxidoreducătoare proton-translocatoare.

Astfel de locuri în care găsim translocare de

protoni în lanțul respirator au fost descrise de Mitchell și Moyle.<sup>(289,290)</sup>

Reducerea rotenon sensibilă a ubiquinonei de către NADH mitochondrial este asociată cu translocarea de protoni.

În ceea ce privește biosinteza ubiquinonei în plantele superioare, alge și fungi, s-a demonstrat că precursor pentru această sinteză servește acidul p-hidroxibenzoic.<sup>(291,292,293,294)</sup>

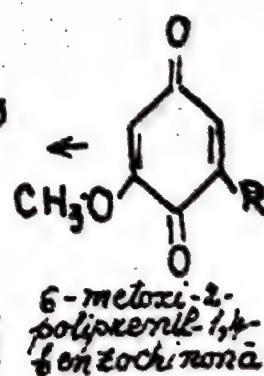
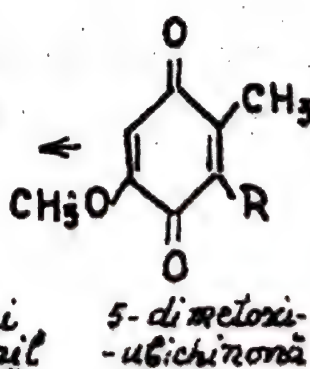
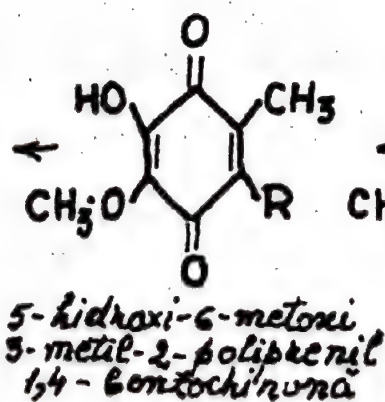
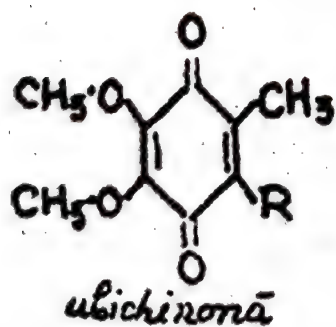
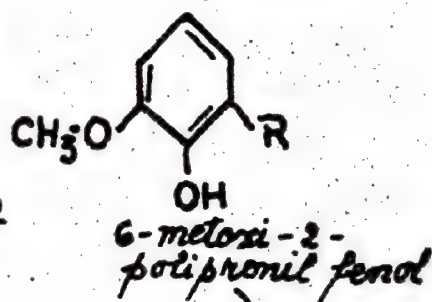
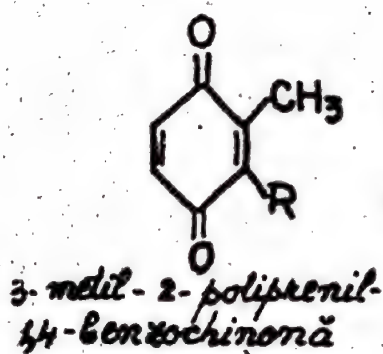
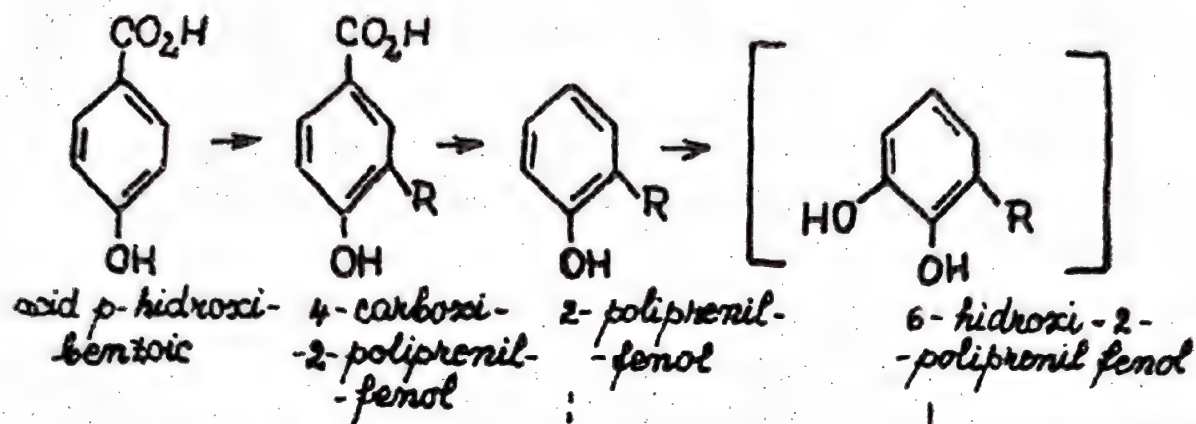
Recent s-a observat încorporarea în ubiquinonă la unele plante a acidului cinamic și a acidului p-cumaric, compuși ce servesc ca precursori pentru acidul p-hidroxibenzoic.<sup>(295,296)</sup>

Urmărindu-se sinteza cu acid  $[U^{14}C]$ -cinamic și cu acid  $[U^{14}C]$ -cumaric, s-a observat că peste 90% din radioactivitate este regăsită în molecula de ubiquinonă și anume, în ciclul p-benzoquinonic.

În celule de drojdie, acidul p-hidroxibenzoic se formează din acid chorismic și apoi se încorporează în ubiquinonă.<sup>(292)</sup>

S-a observat că acidul p-hidroxibenzoic este precursor în biosinteza de ubiquinonă în bacteriile Gram negative fotosintetice și nefotosintetice.<sup>(297,298)</sup> Căile de metabolizare ale acidului p-hidroxibenzoic până la ubiquinona-10 au fost clarificate abia după ce Friis și Folkers<sup>(301)</sup> izolează din bacteriile fotosintetice *Rhodospirillum rubrum*, o serie de fenoli și quinone substituite cu resturi de decaprenil. Din schema următoare se vede sinteza de ubiquinonă din acid p-hidroxibenzoic.<sup>(301)</sup>





Chester<sup>(303)</sup> studiind sinteza de ubiquinonă la *Pseudomonas ovalis*, plecând de la acid p-hidroxi-  
- U  $^{14}\text{C}$  -benzoic a observat că această sinteză este complet inhibată în lipsa oxigenului, cu toate că un grad oarecare de radioactivitate este încorporat în 2-poliprenil fenol.

De aici concluzia că oxigenul atmosferic este indispensabil pentru sinteza de ubiquinonă.

Preparatele aceluare par să nu fie capabile să sintetizeze ubiquinona din acid p-hidroxibenzoic și integritatea celulară pare să fie de asemenea o condiție obligatorie pentru sinteză.<sup>(303)</sup>

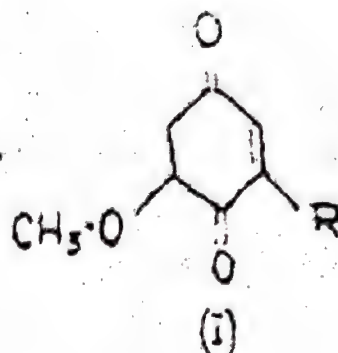
În micelii de *Aspergillus flavus*, prin studii de spectroscopie în ultra violet, cromatografie în strat subțire, studii de spectrometrie de masă, și prin studii genetice, folosind ca precursor acidul p-hidroxibenzoic, s-au identificat o serie de precursori în sinteza de ubiquinonă - 10 care pot fi postulați ca intermediari și într-un număr de bacterii, drojdii, etc.

Din schema care urmează, se vede această cale de biosinteză a ubiquinonei în *Aspergillus flavus*.  
(304)

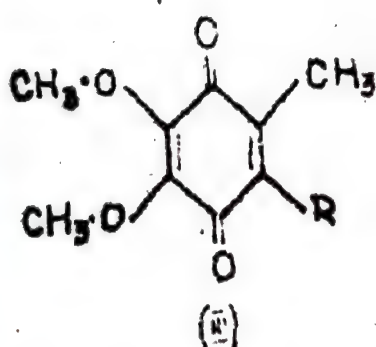




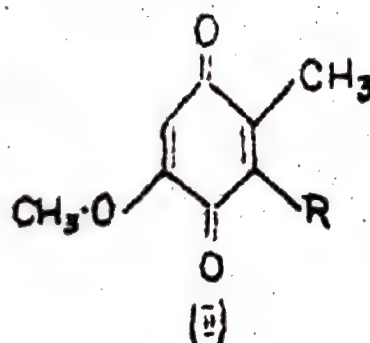
Ac. 4-hidroxi-benzoic



6-Metoxi-2-decaprenil(X.H<sub>2</sub>)-1,4-benzoquinonă



Ubiquinona-10(XH<sub>2</sub>)



5-Demetoxi-ubiquinona-10(X.H<sub>2</sub>)



Calea parțială din biosinteza ubiquinon - 10(X-H<sub>2</sub>) în *Aspergillus flavus*.

În ceea ce privește studiul sintezei ubiquinonei în țesuturile animale, s-a folosit de asemenea ca precursor acidul p-hidroxibenzoic.

Precursori obișnuiți în sinteza ubiquinonei la bacteriile fotosintetice ca: 2-poliprenil fenolii, 6-metoxi-2-poliprenil fenolii, 6-metoxi-2-poliprenil-1,4-benzoquinona, și 5-demetoxiubiquinonele, nu au fost găsiți în țesuturile unui important număr de specii de păsări și mamifere. (305)

Rezultate similare au fost obținute și în studii cu un număr important de plante superioare (306) și fungi. (304)

În 1966 Olson<sup>(306)</sup> demonstrează prezența în ficatul de șobolan a unui precursor al ubiquinonei-9 care absoarbe razele U.V. și care în timp, este supus unei oxidări într-un compus de culoare galbenă care absoarbe lumina la 272 nm, și care poate fi redus cu borohidrida de sodiu. Dacă felii de ficat de șobolan sînt incubate cu 1-<sup>14</sup>C-benzoat, <sup>3</sup>H-benzoat, L-metionina-<sup>14</sup>C, DL-acid mevalonic, U-<sup>14</sup>C-tirozină, acest precursor al ubiquinonei-9 devine radioactiv. Acest compus a fost izolat și identificat<sup>(307)</sup> ca 5-dimetoxiubiquinona-9. Acesta în timpul preparării și conservării, se transformă în diferite tipuri de ubiquinone, inclusiv în ubiquinona-9, observată de Olson. (306,308)

Faptul că în marea majoritate a țesuturilor animale studiate, ca și în bacterii, alge, plante superioare și fungi, găsim cel puțin două ubiquinone, arată lipsa unei specificități absolute a enzimelor în



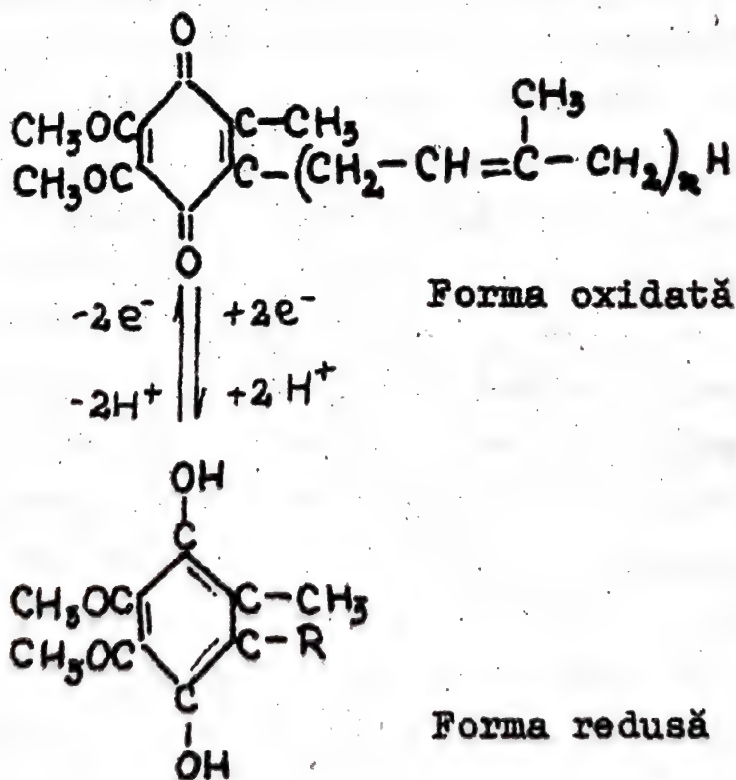
plicate în sinteza ubiquinonelor la nivelul procesului de prelungire a lanțului izoprenoid.

Pentru biosinteza ubiquinonei-9 în cupe de ficat de șobolan, acetatul și mevalonatul, servesc ca precursori ai catenei laterale poliizoprenoide în timp ce nucleul de benzoquinonă poate proveni din fenilamino acizi, pe o cale care implică derivați de benzoat ca intermediari.

Urmărind sinteza de ubiquinonă, pornindu-se dela U-<sup>14</sup>C-fenilalanină și U-<sup>14</sup>C-tirozină, s-a observat că aceasta se face printr-un mecanism deosebit de complex. Complexitatea acestui mecanism rezultă din faptul că metabolizarea amino acizilor poate duce la formarea de derivați de benzoat care pot furniza ulterior nucleul de quinonă iar pe de altă parte, fenilamino-acizii pot fi metabolizați pe o cale ce duce la formarea de acid homogentizinic, acetoacetat și mevalonat, compuși ce pot fi încorporați în lanțul lateral izoprenoid al ubiquinonei (313, 314, 315, 308)

Aiyar<sup>(313)</sup> arată că biosinteza ubiquinonei-9 în ficatul de șobolan este limitată de viteza de formare a mevalonatului necesar în sinteza lanțului lateral izoprenoid. După iradiere totală, sau după administrare de actinomycină D, se constată o creștere a activității 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductazei, enzimă care sintetizează mevalonatul. În felul acesta, atât sinteza de ubiquinonă-9 cât și sinteza de colesterol, au o etapă limitantă comună și anume reducerea 3-hi-

droxi-3-metilglutaril CoA la mevalonat. Vanadium inhibă mai puternic sinteza de ubiquinonă-9 atunci când se folosește ca precursor 1-<sup>14</sup>C-benzoat, decât atunci când precursor este 2-<sup>14</sup>C-mevalonatul. Foamea are oarecum un efect asemănător asupra sintezei de ubiquinonă și colesterol cu acel al vanadiului. (316, 317, 318) O serie de investigații arată că ubiquinona este un transportor de electroni obligator în lanțul respirator iar Kröger și Klingenberg<sup>(287)</sup> consideră CoQ un transportor în lanțul respirator ce funcționează ca moleculă liposolubilă de legătură între flavoproteine și sistemul citocromic în faza lipidică a membranei mitocondriale. Lehninger<sup>(309)</sup> prezintă așa cum se vede mai jos, modul în care CoQ participă în transportul de electroni mitocondrial.



Forma oxidată

Forma redusă

CoQ<sub>6</sub> (n=6)

CoQ<sub>10</sub> (n=10)



Forma oxidată a coenzimei Q are un maxim de absorbție între 280 - 289 nm.

Participarea coenzimei Q în lanțul respirator este demonstrată și prin inhibiția lanțului respirator, în porțiunea dintre NADH dehidrogenază și citocromul b, cu antibioticul piericidina care are o structură asemănătoare cu aceea a CoQ.

În legătură cu participarea ubiquinonei în lanțul respirator, părerile sînt contradictorii. Argumente în sprijinul participării ubiquinonei în lanțul respirator, au fost aduse de Lester<sup>(310)</sup> și Szarkowska<sup>(311)</sup> care au arătat că extracția ubiquinonei din particulele submitocondriale, duce la inactivarea sistemelor succinat oxidazic și NADH oxidazic, inactivare care este reversibilă la adăugare de ubiquinonă.

Reluînd aceste cercetări, Ernster<sup>(312)</sup> demonstrează că inactivarea sistemului NADH-oxidazei și succinat oxidazei, în particulele submitocondriale lipsite de ubiquinonă, are loc pe suprafața substratului a citocromului b.

O demonstrație a faptului că după extracția ubiquinonei schimbări majore au loc în lanțul respirator în regiunea dintre flavoproteine și citocromul b este ilustrată de faptul că flavoproteinele ca atare rămîn active, așa cum arată experimente care implică folosirea de N,N,N',N' - tetrametil-p-fenildiamină (TMPD), și de faptul că etapa din lanțul respirator de la citocromul b la oxigen este funcțional integră, așa cum demonstrează



folosirea menadiolului ca substrat. Menadiolul este un substrat care reduce citocromul b neenzimatic.<sup>(312)</sup>

În general se poate spune că ubiquinona este esențială pentru interacțiunea succinat dehidrogenazei și NADH dehidrogenazei cu citocromul b și că această interacțiune reprezintă o etapă importantă în funcția normală a catenei respiratorii.

Urban și Klingenberg<sup>(319)</sup> demonstrează că ubiquinona din lanțul respirator este localizată în așa fel încât porțiunea benzoquinonică este ieșită din faza lipidică a membranei mitocondriale, în care catena izoprenoidă a ubiquinonei este imersată. Această concepție este în deplin acord cu datele care arată că reacțiile redox din lanțul respirator, au loc într-un mediu apos întrucât acestea sînt puternic inhibitate dacă apa este înlocuită cu D<sub>2</sub>O sau cu glicerol.<sup>(320)</sup>

Potențialul redox al ubiquinonei din particulele submitocondriale, s-a determinat printr-o echilibrare cu sistemul succinat/fumarat la circa 65mV la pH 7,0 cu un raport redox,  $n = 2$

Potențialul redox al ubiquinonei legate, este = 66 mV la pH 7,0 în timp ce potențialul redox al ubiquinonei izolate determinat în soluție etanol-HCl este = 104-112mV la pH 7,0. Si potențialul redox al dimetoxi - sau diclor benzoquinonelor este mai scăzut în soluții apoase decît în soluții de etanol sau benzen<sup>(321,322)</sup> cu circa 10-40 mV. Această poate să indice faptul că porțiunea quinonică a ubiquinonei legată de lanțul respirator este



localizată într-un mediu mai apos decât acela când ubiquinona este solvită în etanol, întrucît potențialul redox al ubiquinonei legată de lanțul respirator, este cu 40-60 mV mai scăzut.

### Citocromii și lanțul respirator.

Histohematina sau miohematina care a fost descoperită în 1886 de către Mac Munn<sup>(324,325,326)</sup> a fost denumită în 1925 de către Keilin<sup>(327)</sup> citocrom.

Sub această denumire sînt cunoscute hemoproteine intracelulare care în formă redusă au optim de absorbție în spectrul vizibil.

În prezent sub denumirea de citocromi, sînt cuprinse toate hemoproteidele intracelulare cu excepția hemoglobinei, mioglobinei, peroxidazei și catalazei. În această grupă de substanțe intră substanțe care au funcții biologice diferite. Rolul unor citocromi este încă neclar; dar probabil toți citocromii acționează în celulă prin oxidare și reducere. Unii citocromi sînt fermenți, iar alții sînt simpli transportori în procesele de oxidoreducere.

Citocromii pot fi definiți cel mai bine drept componenți intracelulari cu spectre de absorbție asemănătoare hemocromogenului și care participă în transferul de electroni.

În transferul de electroni, atomul de Fe din hem, suferă o oxidare și reducere reversibilă între starea  $Fe^{3+}$  și  $Fe^{2+}$ . Prin termenul de hemoproteină se înțelege nu

numai feroporfoproteinele dar și proteine conjugate a căror grupări prostetice sînt chelați de fier, sau alți compuși structurali asemănători porfirinelor.

În lanțul respirator, citocromii participă în transferul de electroni de la flavoproteine la oxigenul molecular. Ultimul citocrom din lanțul respirator poate reacționa cu oxigenul și poartă denumirea de citocrom oxidază. Formele reduse ale celorlați citocromi nu pot fi reoxidate de către oxigenul molecular.

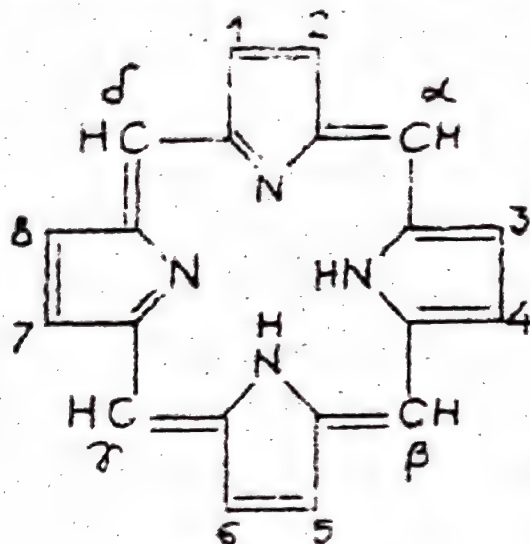
În mitocondriile animalelor superioare și a celulelor vegetale, la care lanțul respirator a fost mai bine studiat, s-au găsit cel puțin cinci forme diferite de citocromi și anume: citocromii  $b, c, c_1, a$  și  $a_3$ . Raportul dintre diferitele forme de citocromi, pare să fie destul de constant. În alte compartimente celulare au fost găsite și enzime heminice, altele decît citocromii amintiți. Astfel citocromul  $b_5$  a fost identificat în reticulul endoplasmatic; citocromi au fost găsiți și în microzomi. În celulele vertebratelor s-au găsit cantități însemnate de enzime heminice, ca peroxidaza și catalaza, a căror rol în oxidările biologice este încă neclar.

Ciclul porfirinic este prezent nu numai în diferite enzime heminice și hemoproteine, dar și în clorofila vegetalelor. Un ciclu porfirinic modificat poate fi găsit și în structura vitaminei  $B_{12}$  (Vitamine hidrosolubile cu rol coenzimatic. Partea I).

Porfirinele sînt derivați de porfină, compus



cu structură tetrapirolică, ce nu se găsește în natură.

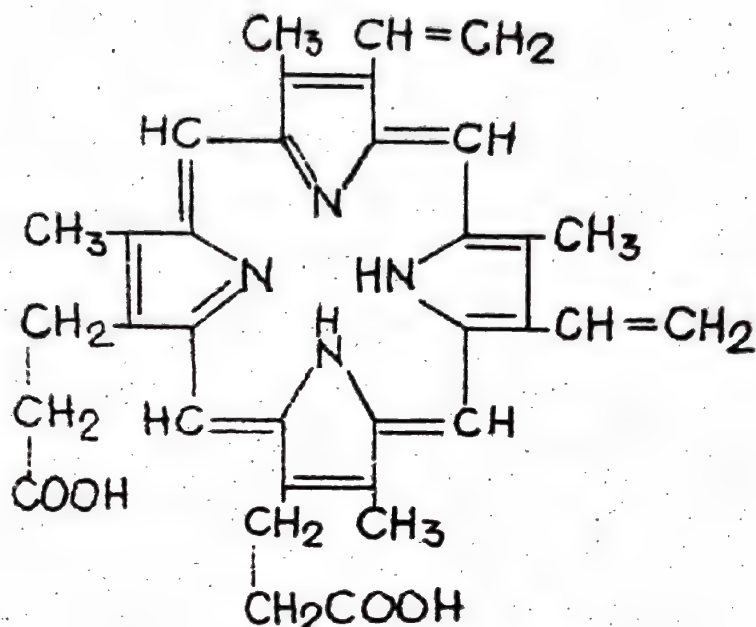


Porfina

Porfirinele sînt clasificate și denumite pe baza substituenților catenei laterale ale acestora în:

- etioporfirine
- mezoporfirine
- protoporfirine
- coproporfirine

Dintre acestea, cel mai frecvent întîlnite sînt protoporfirinele care conțin patru grupări metilice, două grupări vinilice, și două grupări propionice. Intrucît protoporfirinele conțin trei tipuri de substituenți, acestea pot exista în 15 forme izomerice depinzînd de secvența substituției în cele opt poziții. Dintre aceste forme posibile, protoporfirina IX este cel mai des întîlnită și intră în structura hemoglobinei, mioglobinei, și a marei majorității a citocromilor.



### Protoporfirina IX

(1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-  
6,7-dipropionil-porfină)

Sînt două sisteme de nomenclatură pentru izomerii porfirinei, bazate pe raportul fiecărei porfirine în parte, față de izomerii etioporfirinici sau mezoporfirinici. Dacă fiecare ciclu pirollic al porfirinei conține un substituent metilic și un substituent etilic, etioporfirinele rezultate, pot exista în patru forme izomere, indicate în tabelul care urmează, ca tipul I-IV.

O porfirină este considerată de tipul I,II,III, sau IV, în funcție de ce fel de tip de etioporfirină rezultă dacă lanțurile laterale ale porfirinei, sînt convertite în grupări metilice sau etilice, prin procedee



Ruse 4

- 100 -

chimice. Astfel, uro - și coproporfirinele pot fi convertite în etioporfirine prin decarboxilarea lanțurilor laterale acide.

Un al doilea sistem, este bazat pe izomeria mezoporfirinelor. Dacă două cicluri pirolice conțin substituenți metilici și etilici și celelalte două, conțin substituenții metil și acid propionic, pot rezulta 15 mezoporfirine izomere.

Porfirinele care conțin substituenți care pot fi convertiți în aceia a unei mezoporfirine sau a unui izomer similar, pot fi clasificate ca tipul 1 - 15. Astfel, o protoporfirină obținută natural, este convertită în tipul IX, mezomerul de porfirină, prin reducerea grupărilor vinilice ale acesteia.

Compușii 1 - 8 din tabelul care urmează, reprezintă tipurile izomerice raportate la etioporfirină, iar compușii 9 - 21 din tabel, sînt tipurile izomerice raportate la mezoporfirină.

Porfirinele naturale ( protoporfirina ), sînt clasificate în literatură, ca tipul III sau tipul IX, în funcție de sistemul de referință a nomenclaturii folosit.

Amoison

# Denumirea și structura porfirinelor (328)

## Substituenți în pozițiile

Porfirine	1	2	3	4	5	6	7	8
-Etioporfirina I	Me	Et	Me	Et	Me	Et	Me	Et
-Etioporfirina II	Me	Et	Et	Me	Me	Et	Et	Me
-Etioporfirina III	Me	Et	Me	Et	Me	Et	Et	Me
-Etioporfirina IV	Me	Et	Et	Me	Et	Me	Me	Et
-Uroporfirina I	AcOH	Pr	AcOH	Pr	AcOH	Pr	AcOH	Pr
-Uroporfirina III	AcOH	Pr	AcOH	Pr	AcOH	Pr	Pr	AcOH
-Coproporfirina I	Me	Pr	Me	Pr	Me	Pr	Me	Pr
-Coproporfirina III	Me	Pr	Me	Pr	Me	Pr	Pr	Me
-Mezoporfirina IX	Me	Et	Me	Et	Me	Pr	Pr	Me
-Protoporfirina IX	Me	V	Me	V	Me	Pr	Pr	Me
-Deuteroporfirina IX	Me	H	Me	H	Me	Pr	Pr	Me
-Hematoporfirina IX	Me	B	M	B	M	P	P	M
-Clorocruoroporfirina	M	-CHO	Me	V	Me	Pr	Pr	Me
-Pirporfirina XV	Me	Et	Me	Et	Me	H	Pr	Me
-Rodoporfirina XV	Me	Et	Me	Et	Me	-COOH	Pr	Me
-Deuteroporfirin-IX-2,4 - disulfonic acid	Me	-SO <sub>3</sub> H	Me	-SO <sub>3</sub> H	Me	Pr	Pr	Me
- 2,4-Diacetildeutero - porfirina IX	Me	Ac	Me	Ac	Me	Pr	Pr	Me



- 4-Formildeuteroporfirina IX	Me	H	Me	CHO	Me	Pr	Pr	Me
- 2,4-Diformildeuteroporfirina IX	Me	CHO	Me	CHO	Me	Pr	Pr	Me
- Deuteroporfirina-IX-2,4-diacrilic acid	Me	Acr	Me	Acr	Me	Pr	Pr	Me

Prescurtări în lanțul lateral: M,  $-\text{CH}_3$

B,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$

AcOH,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$

Pr,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

V,  $-\text{CH} = \text{CH}_2$

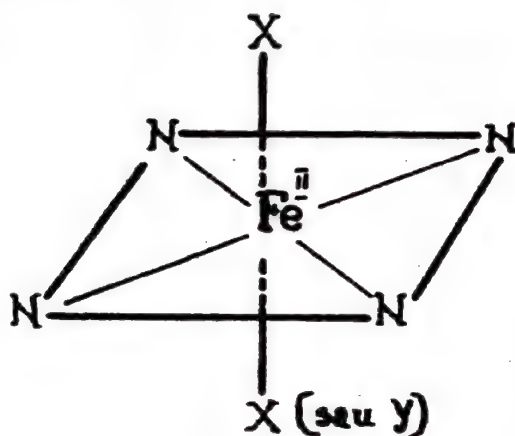
B,  $-\text{CHOHCH}_3$

Ac,  $-\text{COCH}_3$

Acr,  $-\text{CH} = \text{CHCOOH}$

Protoporfirinele formează complexe chelatare quadridentate, cu ioni metalici ca Fe, Mg, Zn, Ni, Co, sau Cu. Un astfel de complex chelatat al protoporfirinei cu FeII poartă denumirea de protohem sau mai simplu, hem. Un complex similar al protoporfirinei cu Fe III poartă denumirea de hemină sau hematină.

In hem cele 4 grupuri de liganzi ai porfirinei formează un complex pătrat-planar cu Fe; pozițiile 5 și 6 coordinative ale Fe rămase libere sînt perpendiculare pe planul ciclului porfirinic. Dacă pozițiile 5 și 6 ale Fe sînt ocupate, structura rezultată poartă denumirea de hemocrom sau hemocromogen.



Hemocrom

In proteinele heminice, mioglobina și hemoglobina, poziția 5 este ocupată de către o grupare imidazolică a unui rest de histidină. In acești compuși, poziția 6 nu este ocupată (deoxihemoglobina și deoximioglobina) sau ocupată de oxigen (oxihemoglobina și



oximioglobina) sau de alți liganzi ca: CO sau CN, etc.

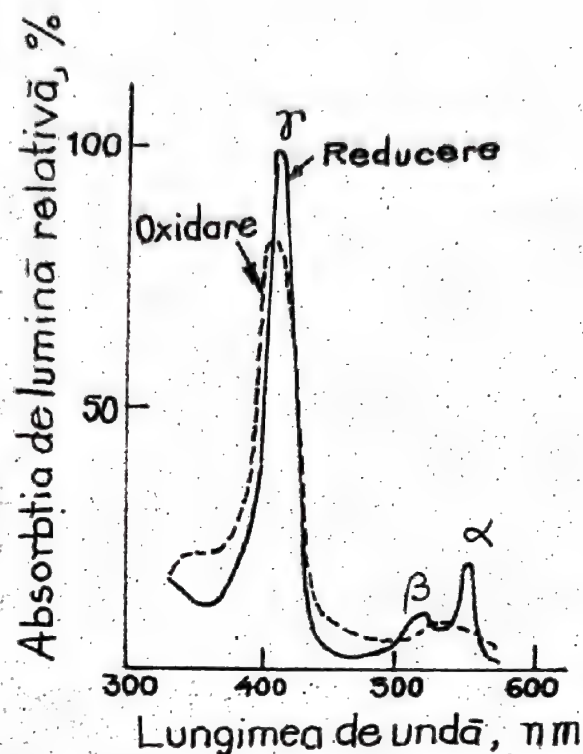
Pe de altă parte, în aproape toți citocromii poziția 5 și 6 a Fe sînt ocupate de către o grupare specifică a unui rest de amino acid al proteinei, astfel încît acestea nu pot fi legate cu liganzi ca:  $O_2$ , CO sau CN. (329)

În hemoglobină și mioglobină, atomul de Fe nu-și modifică valența în timpul fixării sau pierderii oxigenului, rămînînd ca Fe II. Însă atît hemoglobina cît și mioglobină pot fi oxidate la Fe III sau forma hemică de către agenți oxidanți ca fericianura, cu o schimbare de culoare de la roșu la brun. Producții astfel formați poartă denumirea de methemoglobină și metmioglobină. Aceștia nu mai funcționează ca transportori de oxigen.

În citocromi atomul de fier în mod normal este supus schimbărilor între forma Fe II și Fe III. Funcția reală a acestora este de a servi ca transportori de electroni, în timp ce hemoglobina și mioglobina acționează ca transportori de oxigen sau de liganzi.

După poziția caracteristică a benzilor de absorbție în stare redusă citocromii sînt clasificați în trei clase principale: a, b, și c. Fiecare citocrom în stare redusă are trei benzi de absorbție diferite în spectrul vizibil  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$  sau Soret.

În pagina următoare este redat spectrul de absorbție a citocromului c.



Marea majoritate a citocromilor sînt puternic legați de membrana mitocondrială și greu de obținut în stare solubilă și în formă omogenă. Excepție face citocromul c care este ușor extras din mitocondrii în soluții puternic saline. S-a obținut citocrom c în formă cristalină de la mai multe specii și este cunoscută secvența în amino acizi a acestuia. Astfel citocromul c din diferite specii de mamifere, la păsări, reptile, pești conține 104 resturi de amino acizi.

La nevertebrate, pești și plante citocromul c conține 108 resturi de amino acizi. Diferențele în secvența amino acizilor de la diferite specii este minoră.

Analizînd sinteza diferitelor tipuri de cito-



cromi din diverse țesuturi la șobolani s-au obținut următoarele date:

Citocromul	Animal	Țesut	Timp de înjumătățire	Bibl.
Cit. P <sub>450</sub>	Șobolan	Ficat	50 ore	330
cit. b <sub>5</sub>	"	"	4,9 zile	331
cit. b <sub>5</sub>	"	Mitocondrii (ficat)	4,4 zile	332
cit. b	"	"	5,5 zile	333
cit. c	"	"	6,1 zile	333
cit. c	"	Ficat în regenerare	5,4 zile	334
cit. c	"	Rinichi	15,6 zile	335
cit. c	"	Mușchiul scheletic	32 zile	336
cit. c	"	Inimă	43 zile	336

Studiind sinteza citocromului c, Gonzales<sup>(337)</sup> arată că incorporarea de <sup>14</sup>C-lizina în citocromul c se face cu precădere la nivelul reticulului endoplasmatic. Dacă omogenatul de ficat se separă în nucleu, mitocondrii, microzomi și citoplasmă, citocromul c este găsit în toate fracțiunile.<sup>(338,339,340)</sup>

Gonzales<sup>(338)</sup> găsește 38% din citocromul c localizat extramitocondrial. Același autor găsește, apoi 13% din citocromul c localizat extramitocondrial.<sup>(341)</sup>

Prezența unor cantități importante de citocrom c în spațiul extramitocondrial, arată că citocrom

mul c poate avea un rol fiziologic important înafara catenei respiratorii mitocondriale. Pînă în prezent, în acest sens datele din literatură sînt foarte sumare.

Timpul de reînnoire al citocromului c microsomal este de circa 100 de ori mai mare decît a celui mitocondrial.<sup>(342)</sup> Se poate presupune că o parte din acest timp este folosit în formarea unui complex protein-fosfolipidic, care ulterior poate fi transformat în mitocondrie.<sup>(334)</sup>

În literatură sînt descrise 155 tipuri de citocromi, obținuți din diferite organisme pentru care se cunosc potențialele de oxido-reducere.<sup>(343)</sup>

### Citocromii b

Pappenheimer<sup>(344)</sup> arată că după spectrul de absorbție se cunosc 8 tipuri de citocromi b și anume: citocromii b, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>, b<sub>4</sub>, b<sub>5</sub>, b<sub>6</sub>, și b<sub>7</sub>. Citocromul b care este deosebit de răspîndit în țesutul muscular are un maxim de absorbție de 564 nm; citocromul b<sub>1</sub> din bacterii la 560 nm; citocromul b<sub>2</sub> din drojdie la 562 nm; citocromul b<sub>3</sub> din plante superioare la 559 nm; citocromul b<sub>4</sub> din bacterii la 554 nm; citocromul b<sub>5</sub> din creierul de mamifere și păsări la 557 nm; citocromul b<sub>6</sub> din plante verzi la 563 nm etc.

La plante citocromul b<sub>3</sub> și b<sub>7</sub> transportă electronii direct la oxigen, înlocuind astfel citocrom-oxidaza. Citocromul b nu reacționează nici cu cianura nici cu oxidul de carbon; el poate fi redus cu diferiți reducători ca p-fenilendiamina, acidul ascorbic, sau



cel mai bine prin sistemul succin-dehidrogenazic. Pentru acest motiv, citocromul b a fost considerat ca făcând parte din structura succin-dehidrogenazei.<sup>(345)</sup>

Jackson<sup>(346)</sup> arată că citocromul b participă în toate procesele oxidative mitocondriale.

Studiind biosinteza citocromului b în mitocondrii de *Neurospora crassa*, Weiss<sup>(347)</sup> arată că din mitocondriile acestor organisme se poate izola prin cromatografie pe rășină de oleil polimetacrilat o proteină membranară care conține circa 16  $\mu$ mol citocrom b pe gram de proteină. Analizând sinteza citocromului b ajunge la concluzia că acesta conține două lanțuri polipeptidice scurte, de origine citoplasmatică, care poartă hemul grupului b și un lanț lung polipeptidic de origine mitocondrială. Faptul că o parte din structura citocromului b este sintetizată în mitocondrii este relatat și de Mitchell<sup>(348)</sup> și de Clark.<sup>(349)</sup> Greutatea moleculară a acestei proteine membranare este de 55000, din care cele două fragmente scurte au greutatea moleculară de 10000 și 11000, iar fragmentul lung are o greutate moleculară de 32000. Gruparea heminică b este legată de fragmentele mici.

Lehninger analizând unele proprietăți ale citocromilor mitocondriali, găsește pentru citocromul b o greutate moleculară de 30000.

Din tabelul redat în pagina următoare se văd unele proprietăți ale citocromilor mitocondriali.<sup>(353)</sup>

Citocrom	Greutate moleculară	$E'_0$ , volți	Maxim de absorbție în forma redusă nm		
			$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
b	30000	+0,050	563	532	429
c <sub>1</sub>	370000	+0,220	554	524	418
c	13000	+0,254	550	521	415
a	240000	+0,28	600		439
a <sub>3</sub>			603,5		443

Strittmatter<sup>(350)</sup> și Garfinkel<sup>(351)</sup> descriu în microsomi o componentă citocromică pe care o denumesc citocromul b<sub>5</sub> sau citocromul m care ar participa în oxidarea NADH-ului. Nici acest citocrom nu reacționează cu cianura și CO. Rolul biologic al acestuia nu este încă suficient de cunoscut.

Raw și Mahler<sup>(352)</sup> găsesc citocromul b<sub>5</sub> împreună cu o reductază corespunzătoare în mitocondrii de ficat.

În timpul oxidărilor mitocondriale mai aproape de substrat dintre toți citocromii pare să fie citocromul b. La adăugare de antimicină A care inhibă oxidarea succinatului de către oxigen, numai citocromul b rămâne în stare redusă, restul citocromilor fiind oxidați. Aceasta arată că la inhibiția cu antimicina A, citocromul b este situat de partea substratului, iar ceilalți citocromi de partea oxigenului.



Citocromul  $c_1$ , oxidat de sistemul  $a_3+O_2$  numai în prezența citocromului  $c$ ; aceasta demonstrează că față de citocromul  $c_1$  este situat de partea substratului. Acest fapt a fost demonstrat și prin reducerea citocromului  $c_1$  de către succinat în absența citocromului  $c$ .

Dacă clasificarea citocromilor se face pe baza tipului de hem pe care-l conțin, rezultă că numai patru tipuri de hem pot fi întâlnite în structura citocromilor și anume:

- hem  $a_2$
- hem  $a$
- protohem
- hem  $c$ .

Hemul  $a_2$  (hemul verde) cu banda de absorbție  $\alpha$  a hemocromogenului piridinic la 613-620 nm intră în structura citocromului  $a_2$ .

Hemul  $a$  sau hemul dicroic cu banda de absorbție  $\alpha$  a hemocromogenului piridinic la 585-586 nm intră în structura citocromilor  $a$  și  $a_1$ .

Protohemul sau hemul roșu cu banda de absorbție  $\alpha$  a hemocromogenului piridinic la 557 nm intră în structura citocromilor  $b$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_5$ ,  $b_6$ ,  $b_7$  și  $h$ .

Hemul  $c$  cu banda de absorbție  $\alpha$  a hemocromogenului piridinic la 550 nm intră în structura citocromilor  $c$ ,  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $b_4$  și  $f$ .

Structura celor patru tipuri de hem este ilustrată în pagina următoare:





După cum se știe, porțiunea hemică a celor mai multe hemoproteine poate fi separată de porțiunea proteică prin tratare cu acetonă-HCl și hemul  $a_2$ , hemul  $a$  și protohemul pot fi dozate spectrofotometric prin reacția hemocromogen piridinică.

Hemul din citocromii de tip c nu poate fi separat prin acest tratament întrucât două din catenele laterale ale hemului c sînt legate covalent prin legături tioeterice cu resturi de cisteină ale proteinei. Aceste legături sînt rupte prin tratament cu  $Ag_2SO_4$ .

Citocromii  $a$ ,  $a_1$ , și  $a_2$  au afinitate pentru oxigen și CO, iar cei de tip c sînt inerți față de oxigen și CO.

### Citocromul $c_1$

A fost descoperit de Yarushiji și Okumuki.<sup>(354)</sup>

Așa cum s-a mai arătat, în structura citocromului  $c_1$  ca parte constituantă găsim hemul de tip c. Ca și pentru citocromul  $c_1$  s-a demonstrat că ferocitocromul  $c_1$  poate fi ușor oxidat de fericitocromul c și că porțiunea hem a citocromului  $c_1$  insolubil este aceeași ca și a citocromului c solubil. Cu toate că deși porțiunea proteinică a primului este acidă, porțiunea proteinică a celuiilalt este bazică. S-a demonstrat că ferocitocromul  $c_1$  este un donator natural de electroni, legînd citocromul a de citocromul c.

Preparatele de citocrom  $c_1$  puternic purificat au maxim de absorbție în formă redusă la 553, 523 și 418 nm, iar în forma oxidată la 523, 411 și 278 nm.

Conținutul în fier determinat cu ortofenantrolină este de 0,15%. Considerînd că un atom de fier este prezent în fiecare moleculă de citocrom  $c_1$ , se poate deduce pentru citocromul  $c_1$  o greutate moleculară de 36700. Așa cum am arătat mai sus Lehninger<sup>(353)</sup> apreciază pentru citocromul  $c_1$  o greutate moleculară de circa 370000, conținînd 4 grupări hem pe moleculă.<sup>(360)</sup> Preparatele de citocrom  $c_1$  nu se combină nici cu cianura și nici cu CO arătînd că hemul este ascuns în fracțiunea proteică, la fel ca și în cazul citocromului c.

Între citocromii  $c_1$  și c există o serie întreagă de asemănări în ceea ce privește spectrele de absorbție, specia hemului, potențialul redox, modul de legare dintre hem și proteină. Totuși, între aceste două tipuri de citocrom există și deosebiri structurale și funcționale. Astfel, deși hemul este identic în ambele tipuri de citocromi porțiunea proteică este diferită. Citocromul c are activitate citocrom oxidazică împreună cu citocromul a, în timp ce citocromul  $c_1$  nu posedă această activitate. S-ar putea ca aceste deosebiri să se datoreze faptului că fracțiunea proteică a citocromului  $c_1$  este acidă și deci asemănătoare celeia a citocromului a, în timp ce fracțiunea proteică a citocromului c este o componentă bazică.

Citocromul  $c_1$  este rapid redus de agenți reducători ca: borohidrida de potasiu,  $Na_2S_2O_4$ , Acidul ascorbic, cisteina, tioglicolatul de sodiu.

Citocromul  $c_1$  redus, în condiții normale fiziologice, este foarte puțin autooxidabil, este puțin oxidat de către



fericitocromul a și puternic oxidat la adăugarea de cantități infime de citocrom c. Aceste date arată (354, 355, 356, 357, 358) că transferul de electroni se face cu rapiditate mare între citocromii  $c_1$  și c și foarte încet între citocromii  $c_1$  și a. Deci citocromul  $c_1$  este un donator de electroni natural pentru sistemul citocrom-oxidazic constituit din citocromi a și c. Citocromul  $c_1$  este redus enzimatic fie de către sistemul succinat oxidazic, fie de către un sistem NADH-oxidazic, ambele sensibile la antimicina A.

Citocromul  $c_1$  a fost puternic purificat din mitocondrii de mușchi de inimă de șobolan<sup>(354)</sup> și de porc<sup>(359)</sup>. În contrast cu citocromul c, citocromul  $c_1$  este foarte termolabil, o inactivare totală obținându-se după 5 minute la 50°C.

Fragmentând lanțul respirator și reconstituindu-l din componentele care îl formează, King<sup>(361)</sup> descrie clivarea succinat oxidazei în două părți:

-citocrom c reductaza

-citocrom oxidaza

Mai târziu,<sup>(362)</sup> s-a obținut separarea succinat citocrom c reductazei în succinat dehidrogenază și un segment b -  $c_1$ . Cu aceste două fragmente se reușește reconstituirea sistemului activ succinat citocrom c reductazic.<sup>(363)</sup>

Recent, s-a descris o metodă de izolare a citocromului  $c_1$  din inimă de bovine, pornindu-se de la sistemul succinat citocrom c reductazic.<sup>(364)</sup>

Preparatul de citocrom  $c_1$  conține 25 nmoli/mg

proteină. Metoda se deosebește de cele precedente prin faptul că folosește o extracție cu  $\beta$ -mercaptoetanol și o fracționare anaerobă cu sulfat de amoniu. Preparatul obținut prin această metodă are un spectru de absorbție pentru citocromul  $c_1$  redus cu maximum la 552,5; 530; 522,5; 512; 417; 317; 276 nm, și pentru citocromul  $c_1$  oxidat: 558; 522; 411; 355; 276 nm.

Oxidul de carbon și oxigenul nu afectează aceste spectre. Preparatul de citocrom  $c_1$  conține hidrați de carbon circa 2%, flavine extrase în mediu acid circa 0,67 nmoli/mg proteină,<sup>(364)</sup> fier neheminic circa 0,2 nmoli/mg proteină și fier heminic 25,4 nmoli/mg proteină.

Deși spectrul de absorbție pentru citocromul  $c_1$  este asemănător cu acela al citocromului c, în spectrul vizibil la temperatura camerei și în azot lichid ( $-160^{\circ}\text{C}$ ) în spectrul de infraroșu, spectrale de absorbție ale citocromilor  $c_1$  și c reduși sînt diferite, ceea ce arată conformații moleculare diferite pentru cele două tipuri de citocromi. Spectrele de dicroism circular au confirmat această deducție.<sup>(365)</sup>

Citocromul  $c_1$  poate fi folosit ca donator sau acceptor de electroni în legătură cu sistemul de transfer de electroni din particulele submitocondriale din inimă de bovine.

#### Citocromul c

Citocromul c este o hemoproteină care conține o grupare prostetică legată covalent. Nucleul de porfirină este legat de componenta proteinică prin două punți



tiosterice între catenele laterale vinilice reduse și resturile de cisteină. (366,367)

Flatmark<sup>(368)</sup> arată că citocromul c izolat din mușchiul de inimă de bovine, poate exista în mai multe forme moleculare. Astfel prin separări prin metoda disc electroforeză în gel de poliacrilamidă s-au separat 4 subfracțiuni ale citocromului c, descrise ca: Cy I, Cy II, Cy III, Cy IV. Raportul între fracțiunile Cy I - Cy III, a fost de aproximativ 90:9:1 măsurat după absorbția la 416 nm. Un grad asemănător de heterogeneitate a fost obținut și prin cromatografie<sup>(369)</sup> pe Duolite CS-101 și prin fracționare izoelectrică prin electroliză în gradient natural de pH.<sup>(368)</sup> Datele experimentale obținute arată că aceste fracțiuni există și in vivo.

Intrucât studii efectuate cu <sup>59</sup>Fe la șobolani arată schimbări în activitatea specifică a ferului în diferite subfracțiuni ale citocromului c este de presupus posibilitatea conversiei Cy I în alte fracțiuni in vivo.<sup>(368)</sup>

Deoarece toate formele de citocromi c pot fi izolate dintr-un singur organ s-a propus folosirea de izocitocrom<sup>(369)</sup> în analogie cu termenul de izoenzimă<sup>(370)</sup> folosit în denumirea multiplelor forme moleculare ale enzimelor.

Izocitocromii au o serie de particularități fizico-chimice care îi fac să nu fie echivalenți din punct de vedere fiziologic.

Din următorul tabel se văd o serie de proprietăți ale izocitocromilor Cy I - Cy III.<sup>(368)</sup>

	Cy I	Cy II	Cy III
Distribuția la %	90	9	1
Viteza de migrare electroforetică la 0°C	10,80	10,60	10,32
Fracționare izoelectrică(P <sub>a</sub> )	10,80	10,58	10,38
Compoziția în amino acizi [nici o diferență]			
Azot amidic/moleculă	8,40	7,51	-
Potențial redox (volți)	0,247	0,212	0,187
Autooxidabilitate (pH 7)	Cy	Cy II	Cy III
Legarea de CO (pH 7)	0	0	0

Prin cromatografie pe Amberlite I.R.P.64 din citocromul c din *Saccharomyces cerevisiae*, s-au separat doi izocitocromi c a căror compoziție în amino acizi este foarte asemănătoare.<sup>(382)</sup> La aceste celule s-a putut identifica cu ajutorul unui sequenator automatic de amino acizi, o eroare în secvența izocitocromului I în sensul, că resturile 15 și 16 sînt leucină-glicină și nu glutamină-leucină.

S-a demonstrat apoi că în secvența a 35 specii cunoscute de citocromi c mitocondriali, restul 16 este glutamină, în afară de două cazuri de *Neurospora crassa* și de *Candida krusei*, la care s-a considerat că restul



16 este completat cu acid glutamic. (383,384,385)

Tot cu ajutorul unui sequenator automatic de proteine, s-a putut demonstra că restul 16 din citocromul c de la *Candida krusei*, este glutamină și nu acid glutamic.

În acest fel, numai citocromul c de la *Neurospora crassa* rămâne acum cu restul de acid glutamic. Deci cu această excepție, restul 16 din lanțul polipeptidic al citocromului c poate fi considerat ca un rest invariabil.

Optimum de absorbție pentru citocromul c în stare cristalină obținut din drojdie de bere, sub formă oxidată este la 530,410,358,275 nm, iar pentru forma redusă, la 550,520,415,316,275 nm.

Greutatea moleculară a citocromului c din mușchi de inimă de om este de 12750, (371,372) iar din mușchi de inimă de bovine de 12400. (373)

Studiind compoziția în amino acizi a citocromului c izolat din inimă de om, Matsubara (374) găsește în procente următoarea structură:

- ac.aspartic și asparagină	7,69 %
- treonină	6,73 "
- serină	1,92 "
- glutamat și glutamină	9,62 "
- prolină și hidroxiprolină	3,85 "
- glicină	12,5 "
- alanină	5,77 "
- cisteină	1,92 "
- valină	2,88 "
- metionină	2,88 "



- izoleucină	7,69 %
- leucină	5,67 "
- tirozină	4,81 "
- fenilalanină	2,88 "
- triptofan	0,96 "
- lizină	17,31 "
- histidină	2,88 "
- arginină	1,92 "

Intr-un studiu făcut supra secvenței amino acizilor din citocromul c de la 25 de specii acoperind întreaga scală filogenetică s-a găsit următorul fragment polipeptidic de la restul 70 la restul 80 :

Asn-Pro-Lis-Lis-Tir-Ile-Pro-Gli-Thr-Lis-Met  
70 80

Aceasta demonstrează că acest fragment în timpul procesului evoluționar a rămas neschimbat și există foarte puține exemple de acest fel în natură. Acest fragment pare să aibă un rol deosebit în specificitatea de activitate a citocromului c și care este strâns legat de hem și în mod deosebit, un rol esențial pare să-l aibă restul de metionină 80 din structura sa.

De asemeni constant în toate speciile de citocrom c studiate, este restul de triptofan din poziția 59 și resturile de arginină din pozițiile 38 și 91.

Studiind secvența amino acizilor din citocromul c la pești<sup>(411)</sup> (Cyprinus carpio, Squalus sucklii, Cyprinus carpio haemopterus), s-a constatat că spre



deosebire de alte vertebrate, la pești, comun este restul de asparagină 22 și restul de serină 54.

La un număr important de specii, hemul este legat de structura polipeptidică prin resturile de cisteină 14, și 17 care rămân constante față de resturile de amino acizi din imediata apropiere, care variază foarte mult.

Concluzii definitive cu privire la legătura dintre secvența amino acizilor din structura citocromului c de la diferite specii și funcția acestora este greu de stabilit.

Folosind un citocrom c modificat chimic, s-a observat că funcția acestuia ca transportor de electroni, se pierde prin acilarea resturilor de lizină.<sup>(375)</sup>

Este de asemeni precizat rolul esențial a 4 resturi de lizină care pot fi trinitrofenilate și a restului de metionină din poziția 80 pentru funcția biologică a citocromului c.<sup>(376,377)</sup>

Se cunoaște faptul că citocromul c în formă redusă are o afinitate mai mică față de rășina cationică de Amberlit-CG-50, decât forma oxidată a acestuia. De aici se vede că o simplă modificare a valenței Fe din molecula de hem<sup>(378,379,380,381)</sup> induce modificări esențiale în conformația moleculei citocromului c.

Modificarea din conformația citocromului c prin oxidare sau reducere, poate fi atribuită creșterii sau descreșterii numărului de grupări încărcate pozitiv și schimbării în solubilitate. Astfel se știe că forma



redușă a citocromului c este mai puțin solubilă în apă decât forma oxidată.

Se știe de asemeni că ferocitocromul c nu are nici un rest de lizină sau guanidină liber, care s-ar putea lega cu tripsina sau cu altă proteinază bacteriană și că ferocitocromul c nu poate fi atacat de tripsină decât în forma oxidată.

Cu toate că oxidoreducerea este funcția principală a citocromului c și cu toate că un număr considerabil de lucrări s-au ocupat cu aspectele acestei reacții, totuși tabloul acestui proces este încă incomplet.

O serie de autori au arătat că optimum de absorbție de la 695 nm a ferocitocromului c este un indicator sensibil al modificărilor în conformația acestuia. (387,388,389) S-a demonstrat că absorbția la 695 nm se datorește interacțiunii dintre grupul hemic și un rest de metionină. (389,390)

Între absorbția la 695 nm a ferocitocromului c și capacitatea acestuia de a fi redus, există o strânsă legătură. (389,391,392) Faptul că absorbția la 695 nm este dată de legătura hem-metionină, este demonstrat prin aceea că dacă această legătură este ruptă prin carboximetilare, produsul își pierde absorbția la 695 nm și devine incapabil să reducă acidul ascorbic. (392,393)

Pentru citocromul c din inimă de cal, s-a calculat un potențial redox standard de  $+261 \pm 1 \text{ mV}$  la  $25^{\circ}$  I = 0,001 la pH neutru. (394,395,396)

Valoarea potențialului standard redox, deci schimbul de



energie liberă a reacției redox, este rezultatul influenței tuturor componențelor, proteina și porfirină asupra ionilor ferici sau feroși. Acest schimb de energie liberă reprezintă echilibrul dintre schimbările entalpiei și entropiei reacției redox. (395)

Pe baza unor studii termodinamice a oxidoreducerii citocromului c s-a ajuns la concluzia că în soluție apoasă citocromul c este supus după reducere, unei modificări conformaționale delicate, care condiționează reducerea suprafeței moleculei de citocrom c și separarea moleculelor de apă legate de aceasta. Acestea din urmă, folosesc volumul liber obținut de către proteina care se contractă, pentru a forma punți de hidrogen cu apa. Stabilizarea formei reduse în mediul apos este datorită mai mult efectelor de solvatare și mai puțin efectelor legate de conformația proteinică.

Atomul de Fe se leagă în planul ciclului porfirinic cu cea de-a 5-a legătură coordinativă de un atom de azot al ciclului imidazolic al restului 18 de histidină, și prin a 6-a legătură coordinativă de atomul de S al restului 80 de metionină. Liganzi (397, 398, 399) care leagă fierul ca : azida, cianura și imidazolul, pot coordina cu Fe și datele obținute pînă acum arată că acești liganzi se leagă prin îndepărtarea metioninei 80.

Viteza de deslocuire a sulfului metioninei 80 din locul său de coordinare, controlează viteza de reducere a fericitocromului c. (400)

Harbury (401) în studiile sale asupra citocro-

mului c din *Pseudomonas* observă că acesta conține numai un singur rest histidinic iar restul de metionină este legat de hem, în acelaș mod în care a fost descrisă legătura dintre restul de histidină 18 și metionină 80 de hemul din citocromul c de la mamifere.

Proprietățile de donator de electroni a citocromului c au fost examinate în soluție printr-un număr însemnat de metode. Se pare că cele mai simple determinări au fost făcute folosind citocromul c în calitate de oxidant sau reductant propriu, modificările fiind determinate prin spectrele de rezonanță nucleară magnetică<sup>(402)</sup>. Constanta de viteză<sup>(403)</sup> a reacției de ordinul II este destul de mică și anume:  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ . O constantă de viteză mult mai mare a fost computerizată din datele cinetice și din proprietățile de echilibru staționar a lanțului respirator (de circa  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ). Aceeași constantă de viteză s-a obținut și folosindu-se citocrom oxidază purificată ca oxidant.<sup>(404,405)</sup>

Capacitatea extraordinară de donator de electroni a citocromului c este vizibilă în reacția cu sistemul peroxidază-peroxid descris de Keilin<sup>(405)</sup> în 1937. Reacția ferocitocromului c cu complexul enzimă-substrat al citocrom c peroxidazei din drojdie este cea mai rapidă interacțiune proteină-proteină măsurată în soluție.

Timpul de înjumătățire al oxidării citocromului c de către sistemul peroxidazic, este de 70  $\mu\text{sec}$ . Acesta este un timp foarte scurt dacă ne gândim la faptul că este computerizat pentru o activitate enzimatică



care include timpul pentru molecula de citocrom c de a difuza la suprafața intermediarului enzimă-substrat, de a dona electronul său intermediarului peroxidic și de a difuza din loc pentru a permite moleculei următoare, apropierea. În determinarea acestui timp de reînoire sînt implicați doi factori și anume: timpul real de difuzie și timpul real de transfer de electroni. Ultimul trebuie să fie mult mai mic de 70 sec.<sup>(406)</sup>

Chance<sup>(406)</sup> arată că în mitocondriile de la animale electronii sînt transferați de la citocromul c la citocromul a, reacția fiind sensibilă la căldură. Transferul de electroni de la citocromul c la citocromul a este mult mai slab în comparație cu viteza de transfer din reacția citocromului c cu peroxidaza sau peroxidul.

Observînd scăderea activității catalitice a sistemului transportor de electroni care rezultă de pe urma distrucției celulare, se presupune că eficiența acestui sistem în celula vie se datorește unor condiții optime de accesibilitate mutuală a componentelor catalitice.<sup>(407,408)</sup> Această ipoteză a lui Keilin, este atăzată dezvoltată în sensul că mitocondriile celulei integre pot constitui opreliști, stăvilare în calea unei accesibilități mutuale, sub forma unui mecanism de control.<sup>(406)</sup>

O a doua posibilitate de control a accesibilității mutuale a transportorilor de electroni, presupune că transferul de electroni implică nu numai mișca-

rea hemului citocromului c față de un punct fix din moleculă așa cum se vede din schema (A) de mai jos, dar și o juxtapunere a porțiunilor heminice a citocromilor a și c care reduc simțitor probabilitatea unei reacții dintre aceștia, așa cum se vede din schema (B).

Transfer de electroni

Transport de electroni  
prin activare termică



Reprezentarea schematică a diagramei indicând două tipuri de transfer de electroni între citocromi.

Schema (A) reprezintă citocromii c și a în orientare proximală permițând transferul de electroni imediat.

Schema (B) indică porțiunile hem ale citocromului c și a în orientare distală care implică necesitatea unei rotații pentru ca transferul de electroni să se poată desfășura. (406)



În momentul adăugării oxigenului la transportorii reduși din lanțul respirator de la mamifere, unele porțiuni heminice vor fi găsite într-o orientare proximală astfel încât transferul de electroni între citocromul c și a va avea loc deosebit de rapid (schema [A]). Este posibilă însă și o orientare în care o rotație de  $180^\circ$  sau o translație echivalentă sînt necesare pentru a aduce hemul citocromului purtător de electron și acceptorul acestuia, într-un contact adecvat strîns [schema (B)].

S-a determinat concentrația citocromului c în diferite țesuturi animale și vegetale.<sup>(409)</sup> Astfel, conținutul în citocrom c în inima de broască este de 2,6 mg % g țesut umed, la bovine 21 mg % g țesut, la șobolani 53 mg % g țesut; în plămînul de șobolan conținutul în citocrom c este de 2-3 mg % g țesut.

Vernon<sup>(410)</sup> arată că în celulele microorganismului *Rhodospirillum rubrum*, concentrația citocromului c este de trei ori mai mare decît în celulele ficatului.

### Citocromul a, citocromul a<sub>3</sub>, citocrom oxidaza

În lanțul respirator mitocondrial, la mamifere etapa finală este catalizată de așa numitul sistem citocrom oxidazic sau citocrom c oxidazic. Denumirea se bazează pe activitatea sistemului care este capabil pe de o parte să oxideze citocromul c redus, iar pe de altă parte să reducă oxigenul la apă. În condiții nor-

male, energia liberă obținută din oxidarea catalizată de citocrom oxidază poate fi conservată sub forma de legături macroergice pirofosforice în structura ATP.

Otto Warburg <sup>(412)</sup> definește componenta celulară care reacționează cu oxigenul drept hemoproteină.

Citocrom oxidaza descrisă uneori și sub denumirea de citocromul a, este o componentă formată din doi citocromi și anume citocromul a și citocromul a<sub>3</sub>. Citocromul a<sub>3</sub> reacționează cu CO, cianura și azida și este autooxidabil. Citocromul a nu reacționează cu acești inhibitori și nu este autooxidabil.

În structura citocromoxidazei intră deci, citocromul a și a<sub>3</sub>, componente care pot fi distinse chimic și spectral, și ioni de cupru care pot reacționa în calitate de componentă redox, dar problema modului exact în care aceștia intervin în aceste procese rămâne încă deschisă.

Sistemul citocrom oxidazic poate fi considerat ca unul dintre cele mai importante sisteme enzimatice, responsabil direct de folosirea volumului mare de oxigen (probabil mai mult de 90% consumat în timpul proceselor de viață, pe planeta noastră. Încă în 1896 Bertrand <sup>(413)</sup> remarcă în plante prezența unor enzime capabile să catalizeze reducerea oxigenului molecular și pe care le numește oxidaze, a căror structură o postulează a fi metalo proteinică.

În 1924 Warburg <sup>(414,415)</sup> arată că în celulă oxigenul este activat de către o enzimă care conține



fer și pe care o numește enzima respiratorie sau "Atmungs Ferment". El arată că în enzima respiratorie, componenta cu fer este redusă de către metaboliți la starea feroasă și este oxidată de către oxigen la starea ferică. De asemeni arată că atomul de fer transportor de oxigen, este locul de inhibiție a respirației cu cianură. În 1926 tot Warburg<sup>(416)</sup> demonstrează că inhibiția cu CO a respirației celulare este reversibilă la lumină, aceasta fiind o dovadă că enzima respiratorie este un compus heminic.

În 1939 Keilin și Hartree<sup>(417,418)</sup> studiind spectrele de absorbție ale citocrom oxidazei, ajung la concluzia că citocromul  $a_3$  este o componentă distinctă de citocromul  $a$  și că citocromul  $a_3$  este de fapt enzima respiratorie a lui Warburg sau citocrom oxidaza.

În afară de reactivitatea cu cianura și CO, au putut fi stabilite și alte diferențe între citocromul  $a$  și  $a_3$ . Astfel, Chance<sup>(404)</sup> arată că în timpul oxidării succinatului în mușchiul de inimă, reducerea cantitativă a citocromului  $a_3$  (calculată din absorbția la 445 nm) diferă de aceea a citocromului  $a$  (calculată din absorbția la 605 nm).

Smith<sup>(419)</sup> demonstrează că în echilibru într-un sistem care constă din acid ascorbic, citocrom  $c$ , citocrom  $a$ , citocrom  $a_3$  și oxigen, citocromul  $a$  este redus în proporție de 59%, în timp ce citocromul  $a_3$  este redus numai 24%.

Dacă mitocondriile sau celulele întregi sînt

incubate în atmosferă de oxigen în prezență de substrat, citocromul  $a_3$  este oxidat mai rapid decât citocromul  $a$ .<sup>(420)</sup> Citocrom oxidaza la concentrații de  $O_2$  mai mari de 10  $\mu$ mol/l arată de asemeni o oxidare mai mare a citocromului  $a_3$ . La concentrații de  $O_2$  mai mici de 5  $\mu$ mol/l citocromul  $a$  este oxidat mai rapid decât citocromul  $a_3$ .<sup>(421)</sup> În prezență de agenți tensioactivi, reducerea citocromului  $a$  și  $a_3$  este mult diferită.<sup>(422)</sup> Borohidrida care reduce restul carboxilic al hemului a într-o grupare alcoolică afectează numai hemul care se combină cu CO, deci citocromul  $a_3$ , fiind fără nici un fel de efect asupra citocromului  $a$ , dacă borohidrida se adaugă la un preparat de citocrom oxidază în prezența cianurii.

Gibson<sup>(421)</sup> observă că CO legat de citocrom oxidază reprezintă numai o treime față de conținutul în hem al enzimei. Poziunea hemică din citocromul  $a$  și din citocromul  $a_3$  pare să fie identică.<sup>(417,423,424)</sup>

Proteinele native ale citocromului  $a$  și  $a_3$  diferă într-o astfel de măsură încît cu aceeași componentă hemică formează doi compuși cu proprietăți distincte.

Indiferent dacă citocromul  $a$  și  $a_3$  reprezintă sau nu două proteine independente, aceste componente trebuie privite ca două entități independente din punct de vedere funcțional.

În structura citocrom oxidazei găsim două grupări heminice diferit legate de proteină și cupru



puternic legat de structură, care nu poate fi separat prin dializă față de cianură. Raportul cupru:fer ajunge la 1 după dializa enzimei față de cianură sau după tratare cu sephadex conținând un agent chelator pentru cupru<sup>(425)</sup>.

Citocromul c redus este considerat partener de reacție al citocrom oxidazei. Smith și Conrad<sup>(426)</sup> demonstrează că citocromul c este un inhibitor efectiv al citocrom oxidazei și că, capacitatea diferitelor tipuri de preparate de citocrom oxidază de a reacționa cu citocromul c este influențată de compoziția mediului. Estabrook<sup>(427)</sup> găsește că activitatea preparatelor de citocrom oxidază de mușchi de inimă, față de citocromul exogen, este afectată de concentrația tamponului fosfat și remarcă o scădere a  $K_m$  enzimei de ordinul sutelor la concentrații mici de fosfat. La concentrații de hem a, de  $5 \times 10^{-6} M$  și de citocrom c de  $1 \times 10^{-5} M$  reacția este completă în mai puțin de 10 milisec. după inițiere prin amestec. În această reacție numai citocromul a este redus.

Oxidul de carbon se combină numai cu citocromul  $a_3$  (Fe II) formînd un complex fotosensibil. Apariția fotosensibilității poate fi folosită ca un test în măsurarea formării de citocromi  $a_3$  redus, demonstrînd că viteza de combinare a CO cu citocromul  $a_3$  (Fe II) este rapidă în comparație cu viteza generării acestuia în reacția de reducere.<sup>(428)</sup>

Date experimentale arată că citocromul a ( $Fe^{3+}$ ) este redus rapid de către citocromul c ( $Fe^{2+}$ ) în schimb

citocromul  $a_3(Fe^{3+})$  nu este redus de citocromul c.

Yonetani<sup>(429)</sup> în 1960 folosind un preparat înalt purificat de citocrom oxidază de origine animală demonstrează separarea spectrofotometrică a citocromului a și  $a_3$ .

Beechey<sup>(430)</sup> demonstrează prezența citocromului a și  $a_3$  în mitocondriile fosforilante de crab. S-a demonstrat că citocromul a, citocromul  $a_3$  și citocrom oxidaza sînt similare la crustacee și mamifere.

Lemberg<sup>(431)</sup> demonstrează că citocrom oxidaza izolată din inimă de bovine cu detergenți ionici (cholat) conține două entități spectroscopice distincte și anume citocromul a și citocromul  $a_3$ . Totuși rămîne încă neclar dacă această distincție spectroscopică este cauzată de prezența a două hemoproteine distincte sau de către aceeași hemoproteină prezentă în două condiții de mediu diferite. Este de asemenea neclar dacă hemul a este asociat cu un polipeptid sau cu două polipeptide.

Shakespeare și Mahler<sup>(432)</sup> purificînd citocrom oxidaza din drojdie, demonstrează prezența unei singure componente heminice, observație confirmată și de Stotz<sup>(433)</sup> pentru enzima de bovine. Pentru enzima din inimă de bovine Okumuki<sup>(435)</sup> găsește o greutate moleculară de 530.000. Greutatea moleculară pentru fragmentele monomere a fost găsită în jur de 100.000 ceea ce arată posibilitatea unei structuri pentamerice pentru citocrom oxidază.

Love<sup>(433)</sup> izolînd citocrom oxidaza, de asemeni din inimă de bovină în 0,1% emasol (detergent neionic)



găsește o greutate moleculară de 200.000 și observă că enzima disociază în doi monomeri cu o greutate moleculară în jur de 100.000 la  $p_H$  alcalin. Diferențele de solvent pot explica discrepanțele în ceea ce privește aprecierea greutății moleculare.

Chan<sup>(434)</sup> studiind proprietățile spectroscopice și enzimatică ale formei monomerice ale citocrom c-oxidazei în comparație cu forma dimerică a enzimei, observă că forma monomerică (greutate moleculară 100.000) reține 83-97% din activitatea catalitică a dimerului. Expunerea citocrom oxidazei la  $p_H$  alcalin între 9,5 și 11 nu duce la denaturarea enzimei. Activitatea enzimatică a formei monomere și dimerice a citocrom oxidazei măsurată după viteza de oxidare a formei feroase a citocromului c este relativ egală. Această constatare poate fi interpretată în diferite moduri.

O posibilitate constă în aceea că în molecula dimerului transferul unui electron de la citocrom c la citocrom a sau  $a_3$  nu este supusă restricțiilor sterice așa cum s-a observat în cazul reacției cu CO, și că deci nu există nici-o deosebire între citocromul a și  $a_3$  în ceea ce privește transferul de electroni de la citocromul c.

O a doua posibilitate de interpretare constă în aceea că dimerul este considerat ca fiind compus din două porțiuni și anume dintr-un monomer activ din punct de vedere catalitic și dintr-un monomer inactiv. De aceea după disociere nu se observă nici o creștere în activitatea enzimatică. În condiții alcaline este posibil ca

jumătate din moleculă să fie denaturată.

Deși în mediul alcalin asistăm la o disociere a dimerului activitatea enzimatică rămîne aproape integrală (pH=11, tampon emasol-fosfat). Dacă citocrom oxidaza este păstrată la +4°C, aceasta își pierde o bună parte din activitate datorită unei agregări crescute. (433,438)

După depolimerizare, formele monomere nu se asociază în structură dimerică la pH 7 în absența citocromului c. Studiind reasocierea monomerilor în dimeri în prezența citocromului c, s-a observat că în primele 40 minute nu poate fi vorba de un astfel de proces. După 120 minute se observă însă o formare considerabilă de dimeri accelerată de prezența unei concentrații de citocrom c echimolară.

Intrucît forma monomerică a citocrom oxidazei este biologic activă, reasocierea monomerilor în dimeri nu poate fi făcută responsabilă pentru activitatea observată. Dintre cei doi monomeri, unul pare a fi asociat cu activitatea enzimatică, iar cel de al doilea pare să fie implicat în legarea enzimei la membrana mitocondrială internă.

Citocrom oxidaza din drojdia de bere (432) pare a fi un complex tetrameric în care structurile monomere au de asemenea greutatea moleculară în jur de 100000. Enzima din aceste celule pare să fie un complex hemoproteinic care să dețină proprietățile atribuite în mod obișnuit, atît citocromul a cît și citocromul a<sub>3</sub>.



Mason<sup>(439)</sup> solubilizînd citocrom oxidaza din particulele submitocondriale de drojdie de bere, cu cholat (3 mg/mg proteină concentrație finală) după fracționare cu sulfat de amoniu și cromatografie pe coloană de DEAE-celuloză în prezență de 1% Triton X100, constată că enzima conține circa 10 nmoli hem a/mg proteină și că este liberă de orice alte hemoproteine. Greutatea moleculară a enzimei este 190000-225000. Electroforeza în poliacrilamidă în prezență de dodecilsulfat de sodiu (0,03%) împarte enzima în șase benzi polipeptidice majore cu greutăți moleculare de 42000, 34000, 23000, 14000, 12500, și 9500. Toate cele șase componente sînt fizic asociate cu citocrom c oxidaza chiar și după solubilizarea membranei mitocondriale interne.

Pierderea gradată a activității citocrom oxidazei din mitocondrii de inimă de bovine în timpul izolării în prezența cholatului și regenerarea parțială a activității după adăugarea de emasol, au dus la concluzia că probabil lipide guvernează conformația optimă a moleculei de enzimă, pentru funcția biologică, și că emasolul reprezintă un detergent aditiv, funcțional similar pentru moleculă. <sup>(440,441,442)</sup> Datele obținute de Myer<sup>(440)</sup> arată că conformația grupării prostetice în starea oxidată a Fe heminic, nu este afectată de natura detergentului. Scăderea activității enzimei în timpul izolării în prezența cholatului și reactivarea <sup>(442)</sup> cu emasol este atribuită modificărilor în conformație, în special a enzimei reduse de către detergenți sau prin învechire.

Conformația grupărilor prostetice este dependentă de natura detergentului folosit în procesul de preparare, de vechimea preparatului și de starea de valență a hemului a.

Detergentul ionic -acidul dezoxicholic- și învechirea duc la modificări în conformația hemului a, în special în stare redusă a Fe, în timp ce oxidaza oxidată este insensibilă la acești factori.

S-a demonstrat că oxidaza acoperă două grupări hem a, funcțional distincte dar structural identice. Absența interacțiunii<sup>(440)</sup> hem-hem în moleculă, arată că cele două grupări prostetice sînt separate una de cealaltă cu o distanță de cel puțin 10-15 Å. Această concluzie este în acord cu cele două păreri cu privire la constituția enzimei și anume:

- oxidaza este un exemplu de sistem alosteric.
- (443,444) - oxidaza este un sistem cu două componente (citocromul a și citocromul a<sub>3</sub>).

Citocrom oxidaza pare să conțină două componente independente și conformațional distincte.<sup>(440,445)</sup>

Ephrussi și Slonimski<sup>(271)</sup> studiind sinteza citocrom oxidazei în mutante de drojdie, arată că deficitul respirator de la aceste celule se datorește unei alterări ireversibile și ereditare citoplasmatică a structurii și funcției mitocondriilor care cauzează pierderea activității citocrom oxidazei și în același timp pierderea cantităților detectabile spectroscopic de citocrom a - a<sub>3</sub>. Ca urmare se consideră că sinteza



- 136 -

citocrom oxidazei este sub controlul unor determinanți necromozomiali și că acești determinanți pot fi găsiți în mitocondriile ca atare. Observații similare au fost făcute și pe celule de drojdie crescute și în prezența cloramfenicolului care se știe că inhibă sinteza de proteine mitocondriale.<sup>(447)</sup>

Sebald<sup>(448)</sup> arată că cloramfenicolul la concentrații de 4 mg/ml inhibă cu 90-95% incorporarea de amino acizi în toate polipeptidele preparate din citocrom oxidază, în timp ce marcarea proteinelor membrana-re ca atare este inhibată numai cu 30%.

Inhibiția cu cloramfenicol a sintezei de citocrom oxidază simulează fenotipul găsit în "petite" mutantele de drojdie<sup>(449)</sup> și mi-1 mutanta din *Neurospora crassa*.<sup>(450)</sup> De aici s-a tras concluzia că cloramfenicolul inhibă sinteza citocrom oxidazei, prin inhibarea sintezei mitocondriale de proteine. Totuși rămâne încă neclarificată problema modului în care sinteza de proteine mitocondrială își exercită controlul ei asupra formării enzimei legate de membrană.

Weiss<sup>(451)</sup> arată că amino acizii radioactivi sînt încorporați într-un polipeptid dintr-un preparat de citocrom oxidază de către un sistem mitocondrial implicat în sinteza de proteine. Aceasta pare să demonstreze, că sinteza de proteine mitocondrială controlează formarea citocrom oxidazei, contribuind cu o componentă esențială la structura complexă a enzimei. În prezența cloramfenicolului, acumularea de fragmente polipeptidice

de origine extramitocondrială este nealterată. După spălarea preparatului și îndepărtarea inhibitorului, citocrom oxidaza devine din nou marcată chiar și în prezența unor cantități reduse de amino acizi precursori. Aceasta demonstrează clar, că în prezența cloramfenicolului, cel puțin o parte din polipeptidele de origine extramitocondrială sînt sintetizate, dar nu integrate în citocrom oxidaza funcțională. Acest efect al cloramfenicolului pare să indice inhibiția sintezei unei proteine active catalitice implicate în sinteza hemului, sau în altă reacție necesară pentru asamblarea citocrom oxidazei. S-au descris acumulări de proteine mitocondriale în faza citoplasmatică a celulei. Astfel ATP-aza mitocondrială a fost găsită în citoplasmă dacă celulele de drojdie au fost incubate cu cloramfenicol în timpul derepresiei cu glucoză. (452)

Urmărindu-se sinteza polipeptidelor din structura citocromului  $a_3$  cu greutate moleculară de 18000, 17000, 13000, 11000 și 8000, s-a observat că numai primul devine marcat în prezența cicloheximidei, și că celelalte patru, încorporează radioactivitatea în prezența cloramfenicolului. (448, 451)

Citocrom oxidaza, așa cum arată datele din literatură conține 10  $\mu$ mol hem  $a/g$  proteină. Locul de sinteză a polipeptidelor cu greutate moleculară de 36000 și 18000 este neclar. Inhibiția încorporării de  $^{14}C$  din amino acizi indică originea mitocondrială a acestora. Dar marcarea acestora în prezența ciclo-



- 138 -

heximidei a fost de asemeni observată deși nu în aceeași măsură ca în cazul polipeptidului cu greutate moleculară de 18000. Dacă aceste polipeptide sînt sintetizate de ribozomi extramitocondriali, inhibiția marcării în prezența cloramfenicolului ar putea fi datorită faptului că sinteza acestora, poate fi represată de un proces reglatoriu dezvoltat după inhibiția sintezei de proteină mitocondrială.

O altă explicație ar fi aceea că polipeptidele indicate pot fi sintetizate în prezența cloramfenicolului, dar că acumularea lor nu poate fi folosită în asamblarea citocrom oxidazei.

Tuppy<sup>(453)</sup> arată că etapa finală din biosinteza hemului a, gruparea prostetică a citocrom oxidazei, sau transferul acesteia de la locul de sinteză la locul de acțiune, este reglată de mitocondrie.

Reconstrucția citocrom oxidazei folosind particule submitocondriale dintr-o mutantă nerespiratorie "petite" de drojdie ca sursă de apoproteină indică precis că tipul respirator și mutanta nerespiratorie de mitocondrie de drojdie conțin aceeași apoproteină, și că lipsa citocrom oxidazei active din mutanta "petite" de drojdie, se datorește numai indisponibilității citoheminei, sinteza căreia este blocată în mutantă.<sup>(453)</sup>

Conținutul în Cu și Fe al mitocondriilor respiratorii al mutantelor "petite" nerespiratorii de drojdie este asemănător.

Imunochimic și electroforetic nu s-au consta-

tat deosebiri între citocrom oxidaza din mitocondriile respiratorii și nerespiratorii. Aceste date, arată că în mitocondriile cu respirație deficitară a mutantelor de drojdie, poate fi pusă în evidență o proteină ce conține Cu care din punct de vedere electroforetic și a unor proprietăți cromatografice este asemănătoare apoproteinei citocrom oxidazei. Aceasta arată că "petite" mutația nu afectează întreaga moleculă de citocrom oxidază, ci numai gruparea prostetică a acesteia, și că este posibilă reconstituirea activității citocrom oxidazice încorporând citohemină în enzima deficitară. (453)

Integrarea componentei heminice în citocrom oxidază pare să fie codificată de ADN mitocondrial (455, 456)

Kuzela (456) în 1969 arată că sinteza porțiunii proteinice a citocromului aa<sub>3</sub> este codificată de către gene nucleare, dar că inserția acestuia în membrana mitocondrială este efectuată de către un factor de origine mitocondrială.

Codificarea de către ADN-mitocondrial a sintezei unor proteine arată existența unor procese distincte atât la nivelul transcripției ADN cât și la nivelul translației pe ribozomi. În general se poate aprecia că sistemul mitocondrial răspunde la tipul de inhibitori procariotici ai sintezei de proteine. Dar inhibitorii care au jucat un rol important în dovedirea rolului produșilor genelor mitocondriale în



dezvoltarea acestor organele sînt:

- ethidium - inhibitorul transcripției ADN-mitochondrial și al replicăției și
- cloramfenicolul - care inhibă translația pe ribozomii mitocondriali, dar nu și pe ribozomii citoplasmatici.

Așa cum am mai arătat în cazul citocrom oxidazei și ATP -azei, rolul produșilor mitocondriali pare să fie constitutiv, întrucît produșii sintezei de proteine mitocondriale sînt esențiali în dezvoltarea activității acestora.

Așa cum am mai văzut la drojdiile cu capacitate respiratorie facultativă, dezvoltarea activității citocrom oxidazei și ATP-azei necesită nu numai proteine sintetizate de către mitocondrii dar este și obiect al unei inducții funcționale cu oxigen și al represiei cu glucoză. (28,29)

În sinteza de citocrom oxidază participă cu contribuții separate atît mitocondriile cît și faza nucleocitoplasmatică celulară. Deci putem aprecia că sinteza de proteine citoplasmatică și mitocondrială colaborează independent în asamblarea citocrom oxidazei și că fiecare din aceste contribuții în parte este stimulată de către oxigen. (170,457)

În general se consideră că preparatele de citocrom oxidază purificate prin diferite procedee, conțin Cu în cantități de aproximativ același ordin de mărime cu conținutul în hem. (458,459,460,461)

O serie de cercetători postulează participarea Cu din citocrom oxidază în calitate de componentă oxido reductoare funcțională a citocrom oxidazei.<sup>(459)</sup> Sînt însă și autori care consideră Cu ca o impuritate a preparatelor de citocrom oxidază.<sup>(460,461)</sup>

Studii de rezonanță electronică paramagnetică arată că ionul de Cu din citocrom oxidază are calitățile unei constituente funcționale ale acestei enzime. Astfel s-a observat că  $\text{Cu}^{2+}$  din toate preparatele de citocrom oxidază este oxidat paralel cu oxidarea componentelor heminice, uneori cu o viteză asemănătoare. O serie de inhibitori cunoscuți ai citocrom oxidazei ca: azida și cianura, reduc complet Cu din enzimă cu formarea de  $\text{Cu}^+$  în condițiile în care din mediul respectiv dispar semnalele de rezonanță electronică paramagnetică, datorită  $\text{Cu}^{2+}$ . Si hidroxilamina inhibă citocrom oxidaza și în același timp reacționează cu ioni de Cu. Hidroxilamina este cunoscută ca un puternic inhibitor al citocrom oxidazei.

Preparatele de porfirină a extrase din inimă de cal pot fi convertite în hemină a. Există o singură grupare prostetică<sup>(269,446)</sup> pentru citocromii a și  $a_3$ . Porfirina a poate fi considerată ca: 1,3,5-trimetil - 2 - ( $\alpha$ -hidroxialkil)-4-( $\beta$ -alkilvinil)-6,7-di-( $\beta$ -carboxietil)-8-formilporfină.<sup>(446)</sup>

În procesul de maturizare a globulului roșu în sângele periferic și deci în procesul de trecere de la stadiul de reticulocit la eritrocit, se constată o



scădere puternică a capacității respiratorii, care în eritrocitul matur dispare complet. Warburg<sup>(462)</sup> a arătat că restul de consum de oxigen găsit la eritrocite este insensibil la inhibiția cu CO ca urmare a faptului că din aceste celule lipsește citocrom oxidaza. Prankerd<sup>(463)</sup> consideră că pierderea capacității respiratorii și a citocrom oxidazei în procesul de maturizare al eritrocitului se face odată cu dispariția ultimilor resturi de ADN. Glucoza și în cazul reticulocitelor inhibă respirația acestor celule, inhibând pe de o parte dezaminarea unor amino acizi care constituie substraturi pentru respirația acestor celule iar pe de altă parte inhibând activitatea citocrom oxidazei.<sup>(464)(465,466)</sup>

Faptul că s-a obținut o reducere a activității citocrom oxidazei în reticulocite la tratamentul cu histone bogate în lizină sau în arginină, ne face să postulăm că în aceste celule mai există încă rezidii ale unui mecanism de sinteză a acestei enzime sensibil la inhibiția cu histonă.<sup>(466,524)</sup>

Bertles<sup>(467)</sup> remarcă faptul că maturația globulelor roșii este asociată cu conversia ARN în produse cu greutate moleculară mică ce sînt eliminate din celulă. In acelaș sens sînt și observațiile altor autori.<sup>(468)</sup> Scăderea capacității de sinteză a proteinelor la reticulocite în procesul de maturație, merge paralel cu scăderea fracțiunii ribozomale din aceste celule. Aceeași fracțiune pare să fie responsabilă și pentru capacitatea de sinteză a citocrom oxidazei.

Studiind reacția citocrom c oxidazei reduse cu oxigenul, Greenwood<sup>(469)</sup> observă că citocrom oxidaza funcționează ca o unitate cooperativă conținând o moleculă de citocrom  $a_3$ , o moleculă de citocrom  $a$  și 2Cu. Molecula de oxigen difuzînd în această unitate cu o viteză de  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  reacționează succesiv cu citocromul  $a_3$  ( $3 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ ), Cu ( $7 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ ), și citocromul  $a$  ( $7 \times 10^2 \text{ sec}^{-1}$ ), producînd 2 molecule de apă.

Procesele chimice conțin mai mult de patru etape și tot ce se poate ști despre acestea este că sînt foarte rapide, intermediarii avînd timp de înjumătățire mai mici de 10 /usecunde.

Din aceleași cercetări, rezultă că citocrom oxidaza redusă conține proteine heminice numai într-un singur tip de legătură, dar funcțional asociate în perechi în așa fel încît, dacă membru unei perechi leagă liganzi sau reacționează cu oxigenul, urmează o modificare conformațională care împiedică cel de al doilea membru a perechii de a intra în reacție. Cercetările efectuate în legătură cu fixarea CO arată că, mai puțin de jumătate din totalul conținutului heminic se leagă de aceasta. (470,471)

Dacă unitatea funcțională a citocrom oxidazei este capabilă să transfere 4 electroni la oxigen cu formare de apă și de enzimă oxidată, o enzimă denaturată cu o unitate incompletă poate transfera 4 electroni cu formarea, unei enzime conținînd fierul într-o formă înalt oxidată.



Această formă<sup>(472)</sup> este similară cu enzima "oxigenată" formată din enzima oxidată și  $H_2O_2$  ca și cu formarea acesteia prin folosirea succesivă a ditionitului și oxigenului, așa cum a fost descrisă de Orie,<sup>(473)</sup> sau în condițiile lipsei activității catalazei care deasemeni condiționează formarea acestei forme de enzimă "oxigenată". În timpul reacției citocrom oxidazei reduse cu oxigenul în infraroșu apare o bandă caracteristică pentru forma oxidată la 820 nm, care crește cu mărirea concentrației de oxigen până la o viteză de  $6 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ . Această viteză este mai mare decât viteza de oxidare a citocromului a ( $1 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ ) dar mai mică decât viteza maximă de oxidare a citocromului  $a_3$  ( $30 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ ). Banda citocrom oxidazei la 820 nm, forma oxidată pare să fie datorită cuprului.

Cercetările lui Van Gelder<sup>(474)</sup> arată că în citocrom oxidază cuprul se găsește în 2 forme și anume:

- una asociată cu citocromul  $a_3$  accesibilă pentru agenții chelatori.
- alta asociată cu citocrom a inaccesibilă la agenții chelatici.

Intrucât agenții chelatori nu influențează apariția benzii la 820 nm, este de presupus că această bandă trebuie atribuită cuprului asociat cu citocromul a. Apariția benzii la 820 nm ar putea fi interpretată și în sensul unei oxidări a cuprului asociată cu o polimerizare a enzimei și cu un rearanjament intramolecular a hemului a și a hemului  $a_3$ . În acest model reacțional,

Cu ar fi un intermediar obligatoriu între citocromul a și citocromul a<sub>3</sub>.

Pentru biosinteza citocrom oxidazei, de o mare importanță sînt mecanismele care dirijează sinteza porțiunii heminice a acesteia, și în mod deosebit, mecanismele care coordonează acumularea Fe în mitocondrii. Se știe că, în celula animală, sinteza hemului depinde de un sistem multienzimatic, în care componentele enzimatică sînt distribuite între citoplasmă și mitocondrii.

Astfel se știe că mitocondriile, conțin enzimele care catalizează, formarea acidului  $\delta$ -aminolevulinic din glicină și CoA<sup>(476,477)</sup> formarea protoporfirinei IX din coproporfirinogen,<sup>(477,478)</sup> și încorporarea Fe feros în ciclul porfirinic.<sup>(479)</sup>

Incorporarea finală a Fe feros în protoporfirina IX este catalizată de către o ferochelatază ( protohem feroliază E.C.4.99.1.1 ) enzimă puternic legată la porțiunea matricială a membranei interne mitocondrială.<sup>(480)</sup>

Pentru ca ioni de Fe să ajungă în acest compartiment mitocondrial, trebuie să traverseze membrana externă și internă mitocondrială.

Goodman<sup>(481)</sup> descrie acumulări masive de Fe în mitocondriile eritroblastelor provenite de la pacienți cu anemie. Aceasta demonstrează permeabilitatea membranei interne mitocondriale pentru ioni de fer. Acumulări anormale de Fe au fost observate și în alte maladii cu perturbări în biosinteza hemului.<sup>(481)</sup>

În mitocondriile din celule animale a fost demonstrată



o acumulare de Fe, independentă de energie în condițiile în care acestea au fost incubate cu complexe de adenin nucleotide ferice<sup>(482)</sup> sau cu complexe fero-ferice de 8 hidroxichinolină.<sup>(483)</sup> În sfârșit s-a observat că ioni ferici stimulează etapa III-a și etapa IV-a respiratorie din mitocondriile izolate din ficat de șobolan. Acumularea ionilor de Fe în mitocondrii se face pe două căi:

- un mecanism independent de energie
- un mecanism dependent de energie, pH și temperatură.

Ambele mecanisme necesită  $Mg^{2+}$ , sînt inhibate de  $P_a$  și de agenți chelatori ca EDTA, arătînd un **maxim** de eficiență la concentrații de Fe de 0,2-0,3 mM.

La pH de 7,2 acumularea dependentă de energie este de circa 10-15 nM/mg proteină și are loc în mai puțin de 45 sec. Acumularea independentă de energie are loc cu o rată de circa 25 nM Fe/mg proteină/min. cu o acumulare maximală de 180-240 nM Fe/mg proteină.

Mecanismul de acumulare a Fe dependent de energie este răspunzător de transportul prin membrana mitocondrială internă a Fe.<sup>(484)</sup>

Adăugarea la o suspensie mitocondrială a decuplantului F.C.C.P ( carbonil-cianid-p-trifluoro-metoxifenilhidrazonă) produce o scădere semnificativă a acumulării Fe demonstrînd că cel puțin o parte din fierul acumulat este dependentă de potențialul energetic al membranei mitocondriale interne, Si cianura inhibitor specific al

respirației mitocondriale, inhibă paralel cu aceasta și transportul ionului fer.<sup>(484)</sup>

### Lanțul transportor de electroni mitocondrial.

Lanțul transportor de electroni mitocondrial este constituit dintr-un sistem de catalizatori oxido-reducători care mediază oxidarea ionului de hidrogen de către oxigenul molecular. Această definiție a lanțului respirator este astăzi acceptată de aproape toți cercetătorii care lucrează în acest domeniu. Totuși există încă opinii foarte diferite în ceea ce privește:

- natura și numărul catalizatorilor din catena respiratorie,
- secvența componentelor din acest lanț,
- structura și dimensiunile fizice ale lanțului respirator,
- localizarea lanțului respirator în mitocondrii.

Conceptul despre lanțul respirator ca unitate structurală cu poziție precisă, dimensiuni și compoziție precisă, se sprijină pe dovada faptului izolării acestuia. Dacă lanțul respirator este o unitate fizică atunci prin diferite metode trebuie să fie extractibil și izolabil. Dacă nu este o unitate fizică ci o colecție de componente structural separate atunci lanțul respirator va fi neizolabil. Izolarea lanțului respirator demonstrează existența unei unități morfologice în structura căreia este localizat lanțul respirator. În procesul de dezintegrare în etape a mitocondriei în particule



cu greutate moleculară din ce în ce mai mică, se tinde la izolarea porțiunilor ce conțin lanțul respirator complet, și la stabilirea exactă a cantității și proporțiilor în care participă cantitativ în alcătuirea lanțului, respirator diferitele elemente constitutive ale acestuia. Astfel va putea fi precizată apartenența unor componente structurale și funcționale lanțului respirator. Se știe că în ultimii ani, catenei respiratorii clasice i s-au adăugat componente noi oxido-reducătoare de tipul coenzimei Q, cuprului și ferului neheminic.

Dar prezența unor componente în particulele morfologico-structurale ce conțin lanțul respirator nu însemnează obligatoriu și dovada participării funcționale a componentei respective în procesul de transfer de electroni.

#### Izolarea lanțului transportor de electroni în formă de particule submitocondriale

Prin diferite mijloace chimice sau fizice, mitocondriile pot fi rupte și deci fragmentate în particule submitocondriale conținând lanțul transportor de electroni complet. Dovada integrității acestui lanț a fost făcută prin măsurarea capacității de a cataliza oxidarea antimicin-sensibilă a succinatului și a NADH de către oxigenul molecular.

Prin studii de microscopie electronică<sup>(485)</sup> prin studierea caracteristicilor de sedimentare și a pierderii capacității de transport a acidului citric și

a capacității de oxidare a acizilor grași<sup>(486)</sup> s-a demonstrat originea mitocondrială a acestor particule.

Studii electron micrografice au demonstrat că preparatele particulare obținute prin tratament chimic (alcool și fosfat, soluții alcaline diluate<sup>(487,488)</sup> digitonină,<sup>(489)</sup> sau prin tratament fizic (ultrasunete<sup>(490)</sup> sfărîmarea cu bucăți mici de sticlă<sup>(491)</sup> constă în principal din fragmente ale membranei mitocondriale interne, în amestec sau legate de materialul matricial (proteine structurale). În ceea ce privește membrana externă datele sînt încă contradictorii; în orice caz aceasta suferă fragmentări și solubilizări mult mai mari de pe urma tratamentelor indicate.

Intrucît există asemănări între membrana mitocondrială externă și reticulul endoplasmatic, se postulează ideea originii acestuia, a derivării acestuia din reticulul endoplasmatic.<sup>(492)</sup> Deși există similarități în compoziția lipidică, prezența unor enzime în reticulul endoplasmatic și membrana mitocondrială externă (citocromul  $b_5$  și o NADH-citocrom c reductază insensibilă la rotenonă), totuși sînt și deosebiri între aceste două structuri subcelulare. Astfel numai membrana mitocondrială externă conține monoaminoxidaze, iar numai reticulul endoplasmatic conține o NADPH-citocrom c reductază, citocromul  $P_{450}$ , glucozo-6-fosfataza ca și o oxidază cu funcții complexe.

Studii recente postulează un schimb de fosfolipide între membrana mitocondrială externă și micro-



zomi și lipsa acțui schimb între membrana internă și membrana externă.<sup>(493)</sup>

Lehninger<sup>(494)</sup> consideră membrana externă mitocondrială ca un strat protector al mitocondriei față de agresiunea microorganismelor.

Există date care aseamănă membrana bacteriană cu membrana internă mitocondrială. Ambele tipuri de membrană au un conținut mare de cardiolipină și includ aportul de fosforilare oxidativă al celulei.

Atât bacteriile cât și mitocondriile conțin ADN, sintetizează proteine și acizi nucleici. Există însă fără îndoială și deosebiri esențiale între aceste două tipuri de membrane. Dacă s-ar considera mitocondria de origine parazitară, atunci membrana externă ar reprezenta contribuția celulară la stabilirea relațiilor simbiotice dintre mitocondrie și celulă. Membrana externă deci, ar izola mitocondria de restul celulei. Avînd un conținut corespunzător fosfolipidic, membrana externă este ușor permeabilă pentru moleculele mici ca: nucleotide, săruri, zaharoză etc. Macromoleculele nu permează prin membrana externă, deși în 1970 Racker<sup>(495)</sup> arăta că mitocondriile din inimă de bovine au membrana externă permeabilă, pentru proteine ca citocromul c și  $\gamma$ -globuline. Unii consideră această observație ca fiind datorită lezării membranei externe în timpul izolării mitocondriilor.<sup>(496)</sup>

Așa cum am mai arătat, principala funcție a membranei interne mitocondriale, constă în activitatea lan-



țului respirator încorporată în această structură. Activitatea respiratorie a membranei interne mitocondriale, a fost stabilită prin cercetări efectuate în trei direcții importante:

- izolarea de proteine pure capabile să catalizeze reacții de oxidoreducere cu donatori artificiali de electroni sau cu acceptori de electroni,

- izolarea de complexe care catalizează segmente din lanțul respirator cu scopul de a fi folosite în reconstituirea întregii catene respiratorii pentru oxidarea unor substanțe naturale ca NADH sau succinat,

- izolarea unor componente individuale ale lanțului respirator cu scopul de asemenea de a fi folosite în reconstituirea întregii catene respiratorii pentru oxidarea substratelor naturale.

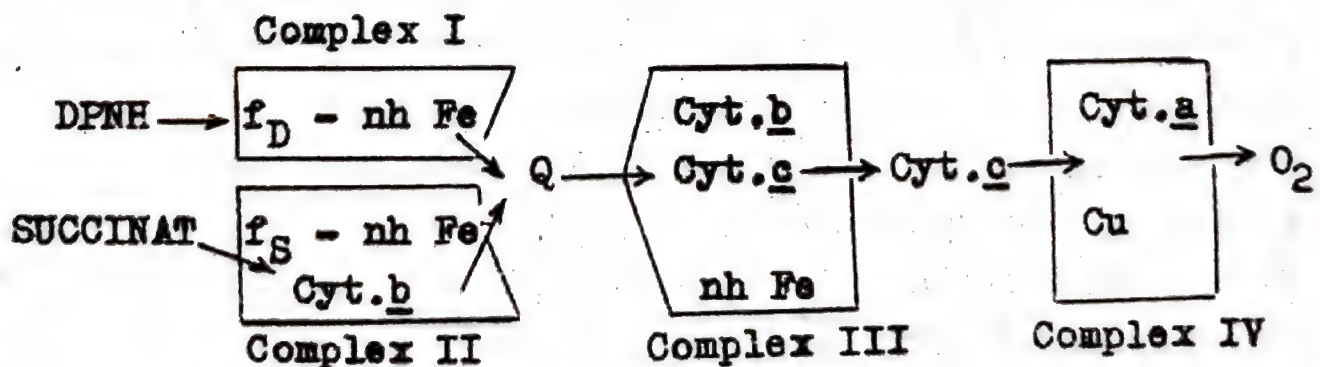
In prima direcție s-au izolat proteine, s-au purificat și s-a constatat că în timpul acestor procese apar modificări substanțiale structurale care pot altera funcția fiziologică a acestora. Astfel s-a reușit izolarea unei succinat dehidrogenaze capabilă să oxideze succinatul în prezența unor acceptori artificiali de electroni. De remarcă este faptul că enzima după purificare nu mai poate fi folosită pentru recombinație cu membrana internă mitocondrială. (497,498)

Green<sup>(499)</sup> formulează catena transportoare de electroni mitocondrială sub forma a patru complexe primare și a unor componente mobile (coenzima Q și citocromul c). Din figura următoare se vede că toate componen-



tele incluse în suprafața limitată reprezintă complexele primare și sînt deci componentele fixe ale lanțului respirator. Secvența din interiorul complexului nu este specificată, iar stoechiometria este prezentată numai pentru compuși selectați (marcați cu numere în paranteze). Se folosesc următoarele prescurtări :

- $f_D$  = flavoproteină fără Fe cu activitate NADH-dehidrogenază
- $f_S$  = flavoproteină fără Fe cu activitate succinat dehidrogenază
- $nh\ Fe$  = Fe neheminic
- Cyt = citocromi
- Q = coenzima Q



Din membrana mitocondrială internă<sup>(500,501)</sup> s-a izolat o NADH dehidrogenază activă în reconstrucția complexului I.

În complexul I atît NADH dehidrogenaza, cît și o proteină care conține Fe și S par să fie protejate de către o pătură hidrofobă de lipide și proteine structurale. Această structură este indicată de faptul că eliberarea NADH dehidrogenazei și a proteinei -Fe,S din complexul I se face numai după tratarea cu agenți ca : uree, guanidin hidroclohid, perclorat de sodiu și tiocianat. Acești agenți acționează asupra structurii și lipofiliei complexului I, de faptul că ditionitul nu este capabil să reducă NADH dehidrogenaza și proteina Fe,S din complexul intact, dar le reduce rapid după solubilizarea acestora; ca și de faptul că chelatori ionici ca Triton și bathofenantrolina sulfonat nu reacționează cu componenta Fe din complexul I intact dar reacționează cu Fe din acest complex eliberat după tratare cu agenții indicați mai sus.

În complexul I reducerea fericianurei de către NADH dehidrogenază nu este inhibată de către PCMB (paraclormercuribenzoat) dar este imediat inhibată după solubilizarea enzimei.

Spre deosebire de NADH dehidrogenaza solubilă complexul I are o foarte mică activitate menadion reductază și diclorfenolindofenol reductază(DCPIP) și nu are nici un fel de activitate citocrom c reductază in-



sensibilă la antimycină.

Albracht și Slater<sup>(502)</sup> izolează din complexul I și III la tratament cu pentan o NADH citocrom c reductază, fără coenzima Q și sensibilă la rotenonă.

Din mitocondrii, cu ajutorul unor enzime proteolitice sau prin tratament cu dodecilsulfat, s-a izolat citocromul b activ în recombinație cu succinat dehidrogenaza și cu fosfolipide în formarea unui complex capabil să reducă coenzima  $Q_{10}$  în prezența succinatu-lui și în condițiile în care citocromul b pare să participe direct în procese oxidoreductive.<sup>(503,504)</sup> Preparatele de citocrom b tratate cu dodecilsulfat își pierd activitatea catalitică, dar își păstrează rolul structural în calitate de componentă a membranei interne mitocondriale în timp ce citocromul b expus la proteoliză își păstrează activitatea catalitică pierzându-și rolul structural.

Horstman<sup>(505)</sup> arată că o altă componentă a membranei interne și anume așa numitul factor  $F_1$  își pierde capacitatea de a funcționa în calitate de componentă structurală a membranei după tratarea cu enzime proteolitice fără pierderea activității ATP-azice a acesteia.

Pullman<sup>(506)</sup> arată că tratarea cu tripsină sau chimotripsină duce la activarea ATP-azei mitocondriale ca rezultat al distrugerii unui inhibitor deosebit de sensibil la digestia proteolitică. Aceste constatări au determinat pe cercetători ca în procesul de pu-

rificare a ATP-azei să elimine acest inhibitor prin separarea enzimei din complex.

Inhibitorul ATP-azei mitocondriale pare să fie un factor implicat în procesul de fosforilare oxidativă, cu rol în controlul acestui proces.

Din membrana internă mitocondrială s-a izolat citocrom c cu efect reconstitativ. (507,508)

Dificultățile reale întâmpinate în efortul de reconstituire a lanțului respirator din componentele individuale s-au datorit în special labilității citocromului b.

S-a mai observat că reconstituirea catenei respiratorii în prezență de fosfolipide extrase din soia, a fost mai activă dar mai puțin stabilă decât reconstituirea efectuată cu fosfolipide obținute din mitocondrii de inimă de bovine. O capacitate respiratorie maximală s-a obținut în condițiile în care raportul fosfolipide/proteine este în jur de 0,5.

Yamashita și Racker<sup>(508)</sup> reconstituie un complex care catalizează oxidarea succinatului de către oxigenul molecular, prin combinarea de enzime purificate din mitocondrii de inimă de bovine, cu fosfolipide și coenzima  $Q_{10}$ . Activitatea este dependentă de succinat dehidrogenază, citocromii b, c,  $c_1$ , și citocrom oxidaza dar nu necesită adăugarea de proteină cu Fe neheminic. Reconstituirea complexului necesită o perioadă de timp îndelungată, iar viteza de oxidare a succinatului este comparabilă cu aceea obținută cu particulele fosfori-



lante submitocondriale. S-a izolat din membrana internă mitocondrială și citocrom oxidază. Cu toate că citocrom oxidaza izolată este activă în reconstituirea complexului succin oxidazic, nu s-a putut demonstra că enzima a dobândit toate proprietățile citocrom oxidazei legate de membrană. De fapt, concentrațiile mari de citocrom c necesare pentru saturarea acestui sistem, sugerează că prin purificare, enzima suferă modificări esențiale.

In a doua direcție, se fac încercări de separare din lanțul respirator a unor segmente capabile să catalizeze reacții parțiale.

Hatefi<sup>(509)</sup> descrie patru astfel de complexe cu ajutorul cărora poate fi reconstituit lanțul respirator pentru a cataliza oxidarea NADH și a succinatului. Complexul I conține NADH dehidrogenaza care catalizează oxidarea NADH în prezența unor acceptori artificiali ca: ferici-anura sau fenazin metosulfatul; acest complex mai conține și proteine cu Fe neheminic și coenzima Q.

S-a observat că cele două proteine separabile, acționează secvențial în reducerea coenzimei  $Q_{10}$ .

Complexul II conține succinat dehidrogenază și citocromul b; acesta catalizează reducerea coenzimei  $Q_{10}$  de către succinat. Complexul III conține citocrom b, citocrom c și citocrom  $c_1$  și de asemenea o proteină cu Fe neheminică. Acest complex catalizează reducerea citocromului c de către coenzima Q redusă.

Complexul IV este reprezentat de citocrom

oxidază și conține citocromii  $a$  și  $a_3$ , catalizând oxidarea citocromului  $c$  redus.

Toate complexele conțin fosfolipide, și în anumite condiții interacționează unul cu altul în vederea reconstituirii lanțului respirator. Complexele I, III, și IV dacă se reconstituie, catalizează oxidarea NADH. Asocierea complexelor II, III, și IV duce la oxidarea succinatului. Sistemele reconstituite au proprietățile lanțului respirator din membrana mitocondrială în ceea ce privește sensibilitatea la inhibitori ca rotenona sau antimycina. (500)

Complexele reconstituite nu catalizează fosforilarea oxidativă.

In a treia direcție se fac încercări de izolare a componentelor individuale ale lanțului respirator cu scopul de a se păstra activitatea în procesul de reconstituire a lanțului. Deocamdată se încearcă reconstituirea proceselor oxidative, scopul major dar deocamdată mai îndepărtat este de a se reuși o reconstituire a procesului complex de fosforilare oxidativă. S-au izolat 5 enzime din catena respiratorie fără pierderea activității reconstitutive. Acestea sînt: succinat dehidrogenaza, citocrom  $b$ , citocrom  $c_1$ , citocrom  $c$  și citocrom oxidaza. Dintre acestea numai succinat dehidrogenaza (510), citocrom  $c$  (507) și citocrom oxidaza (511) sînt capabile de activitate reconstitutivă atît în procesul de fosforilare cît și în procesul de oxidare. Amestecarea acestor



cinci componente în prezență de fosfolipide și de coenzima  $Q_{10}$  duce la formarea unui complex care catalizează oxidarea succinatului cu o capacitate comparabilă, cu aceea a particulelor submitocondriale fosforilante. Oxidarea este complet inhibată de antimycina A și de cianură. (508)

Tratamentul fizic și chimic al mitocondriilor duce la fragmentarea membranei interne în particule mici care conține un număr variabil de lanțuri transportoare de electroni intacte. Acestui tip de particule i s-a dat denumirea de ETP (electron-transfer-particule). (487)

Separarea lanțurilor transportoare de electroni de proteinele structurale matriciale necesită utilizarea dificilă a detergenților.

La un grad mare de puritate a lanțului respirator izolat, conținutul în citocrom a al preparatului este de circa 6  $\mu\text{moli/mg}$  proteină în comparație cu conținutul în citocrom a de 1,3 din mitocondriile intacte.

Pe baza datelor obținute în legătură cu structura lanțului respirator, (499) se poate presupune că într-o unitate particulată găsim o moleculă de flavină a succinat dehidrogenazei și șase molecule de citocrom a pe lanț, ceea ce dă lanțului respirator o greutate moleculară de  $1 \times 10^6$ .

În formă izolată, lanțul respirator este lipsit de aportul de proteină care cuplează transportul

- 159 -

de electron cu sinteza de ATP, și de asemeni este lipsit de enzimele ciclului acidului citric ca și de proteinele contractile. În acest context, catena respiratorie poate fi imaginată sub forma unui set "fixat" de proteine care sînt prezente într-o proporție moleculară constantă în timpul procesului de izolare. Citocromul c și coenzima Q se extrag în concentrații diferite în timpul procesului de izolare, de aceea sînt considerate componente variabile ale lanțului respirator cum s-a văzut din schema prezentată mai înainte.

Pornind de la faptul că izolarea lanțului transportor de electroni este posibilă sub forma unei unități particulare liberă de proteinele structurale și care conține aceleași componente fixe în aceleași proporții moleculare ca și acelea găsite în lanțul mitocondrial transportor de electroni s-a postulat că lanțul respirator este o unitate integrată cu o poziție fixă și structură exactă.

Legătura dintre diferitele componente ale lanțului respirator este fie proteină-proteină, fie proteină-lipid. Este de menționat că macrounitățile transferului de electron sînt compuse din subunități care nu se separă în timpul procesului de izolare. <sup>(499)</sup>

Lanțul mitocondrial transportor de electroni poate fi separat în patru complexe primare fundamentale fiecare dintre ele reprezentînd un segment al lanțului respirator. <sup>(216, 512, 513, 514)</sup>

Combinarea celor patru complexe reface complet catena



respiratorie. Fiecare complex reprezintă o unitate funcțională și morfologică separată. Reacțiile catalizate de fiecare complex nu pot avea loc dacă proteinele care cuprind complexul sînt separate unele de altele și adăugate ca entități separate. În acest sens complexul este o unitate integrată funcțional care nu poate fi despărțită în proteine componente, fără pierderea completă a activității integrate. (499)

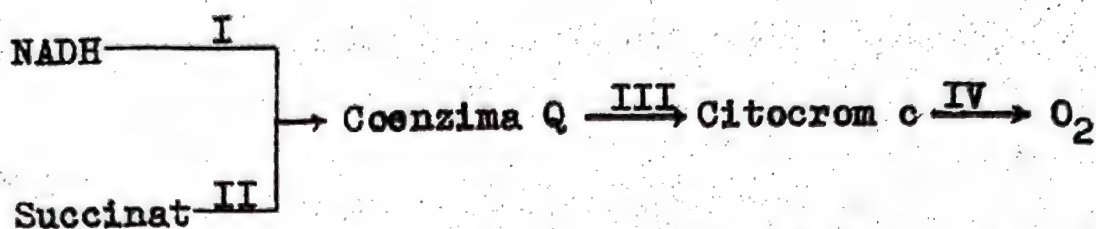
În studiile în legătură cu reconstituirea lanțului respirator s-a stabilit faptul că cele patru complexe pot reasocia spontan pentru a forma catena transportoare de electroni completă și că fiecare unitate a lanțului respirator este constituită din cîte o moleculă din fiecare din aceste patru complexe.

Greutatea moleculară a celor patru complexe izolate este aproximativ egală cu greutatea moleculară a catenei respiratorii purificate deși sînt date care arată că greutatea catenei poate să fie ceva mai mare întrucît în asamblarea lanțului respirator poate să participe și proteinele structurale.

Suma greutăților moleculare a celor patru complexe (515) este de  $3,5 \times 10^6$ .

#### Secvența componentelor din lanțul respirator

Green (499) dă următoarea schemă a componentelor din lanțul respirator:



În oxidarea NADH catalizată de complexul I, componenta flavoproteinică și ferul din proteina cu fer neheminic, suferă o schimbare de valență. Ambele componente sînt atît de repede reduse de către NADH încît este foarte greu de precizat secvența participării acestora în reacțiile de oxidare. Totuși, se presupune că ordinea  $\text{NADH} \longrightarrow f \longrightarrow \text{Fe}$  pare cea mai probabilă întrucît s-au obținut preparate în care capacitatea de oxidare a NADH de către o flavoproteină în prezența unor acceptori artificiali de electroni este conservată în timp ce reducerea Fe neheminic de către NADH este complet blocată. Faptul că NADH poate reduce flavoproteina în condiții în care Fe este nereductibil, pledează pentru considerarea grupării flavinice ca acceptor primar de electroni. În aceste condiții Fe neheminic va fi situat pe suprafața orientată înspre  $\text{O}_2$  a flavinei, după schema : (499, 516)



Studii de rezonanță electronică paramagnetică de spin (499) au precizat oxidarea rapidă a flavinei reduse și a Fe neheminic de către CoQ.

Aceleași argumente explică și secvența reacțiilor de oxidare a succinatului în complexul II în sensul redat de schema:



Succinat  $\longrightarrow$  flavină  $\longrightarrow$  Fe neheminic  $\longrightarrow$  CoQ

Complexul II conține și o moleculă de citocrom b pe moleculă de complex. Rolul citocromului b în acest complex nu a fost încă bine precizat. Se bănuiește însă, că ar putea contribui la legarea complexului I de complexul II. Și relațiile spațiale ale citocromului b cu complexul III sînt încă insuficient cunoscute.

Complexul III catalizează oxidarea coenzimei Q reduse<sup>(512)</sup> de către citocromul c.

În structura complexului III s-au identificat 3 componente oxido-reducătoare și anume:

- citocromul b (2 molecule)
- proteină cu Fe neheminic
- citocromul  $c_1$

În prezența antimycinei A, citocromul b este rapid redus de către coenzima Q redusă în condițiile în care nici proteina cu Fe neheminic și nici citocromul  $c_1$  nu sînt reduse.<sup>(512,517)</sup>

Aceste date demonstrează poziția citocromului b în lanțul respirator în imediata apropiere a coenzimei Q.

Fe neheminic și citocromul  $c_1$  sînt rapid reduse de către coenzima Q redusă.

Cu ajutorul acestor date și prin măsurători a potențialului de oxido-reducere a Fe neheminic și citocromului  $c_1$  s-a ajuns la următoarea formulare a acestui segment din lanțul respirator:<sup>(518)</sup>

CoQ redusă  $\longrightarrow$  Cit.b  $\longrightarrow$  Fe neheminic  $\longrightarrow$  Cit  $c_1$   $\longrightarrow$  Cit.c

Oxidarea citocromului c redus de către oxigenul molecular este catalizată de complexul IV în care găsim cel puțin trei componente:

- citocromul a,
- citocromul  $a_3$ ,
- cuprul.

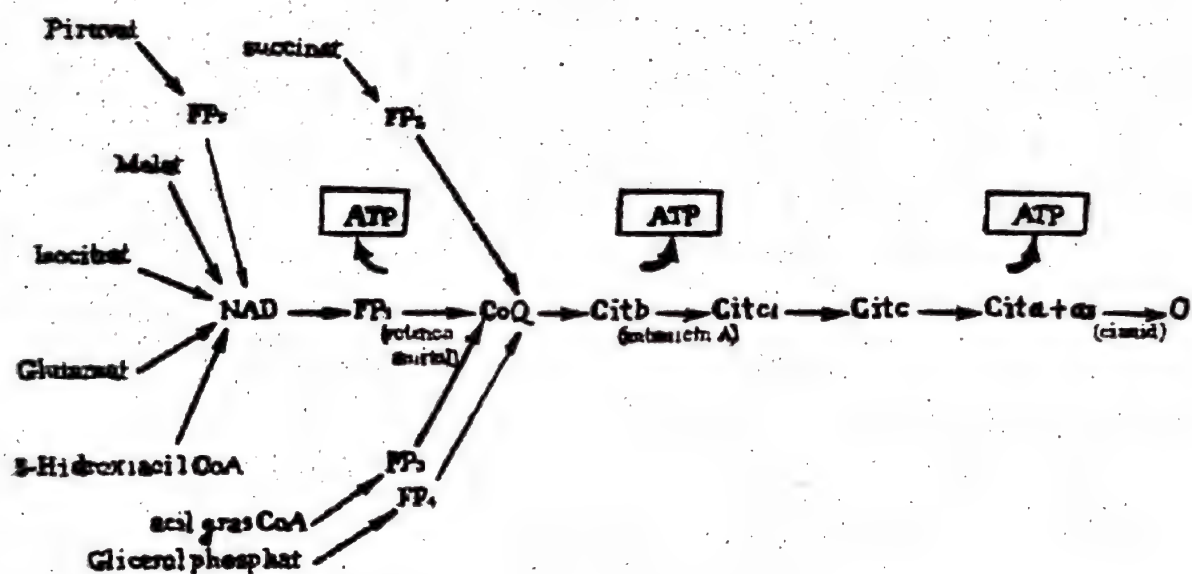
Studii spectrofotometrice efectuate de Gibson<sup>(519)</sup> au demonstrat că în secvența reacțională a lanțului respirator, citocromul a este prima specie redusă de către citocromul c redus, și că citocromul a redus la rândul lui este acela care reduce citocromul  $a_3$ . La rândul său, citocromul  $a_3$  este oxidat de către oxigenul molecular.

Lehninger<sup>(520)</sup> în schema de mai jos propune următoarea secvență reacțională a transferului de electroni în catena respiratorie, apreciind că aceasta este în concordanță cu potențialele redox ale diferiților transportori de electroni, în sensul că potențialul devine din ce în ce mai pozitiv cu cât electronul trece mai departe de la substrat la oxigen. Această schemă este susținută și de faptul că experimente reconstructive in vitro cu transportori de electroni izolați indică tocmai această secvență reacțională. Este cunoscut faptul că NADH poate reduce NADH dehidrogenaza, dar nu poate reduce direct citocromii b, c sau  $a+a_3$ .

De asemenea, NADH dehidrogenaza nu poate reacționa direct cu citocromul  $a+a_3$  ci necesită prezența citocromilor b și c.



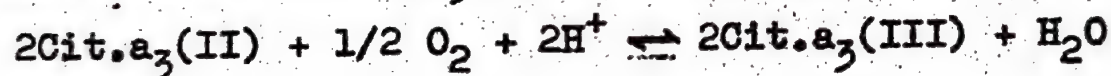
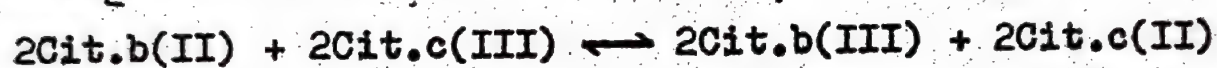
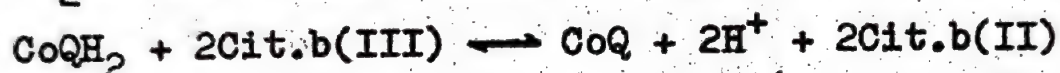
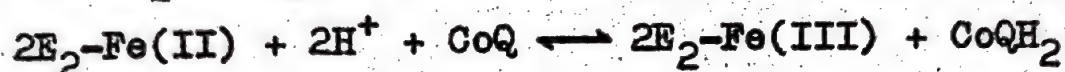
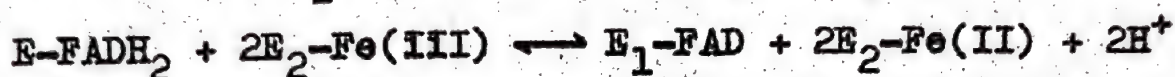
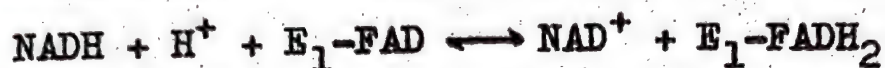
Schema de mai jos este confirmată și de izolarea complexelor despre care am vorbit mai înainte cu componentele de transportori cunoscute.



Lanțul respirator în care sînt arătate locurile de inhibiție ale transportului de electroni și locurile de conservare ale energiei (ATP).

Din tabelul de mai jos se vede secvența reacțională a transportului de electroni așa cum este prezentată de Lehninger.<sup>(520)</sup>

Reacțiile secvențiale ale transportului de electroni



Sînt folosite următoarele prescurtări :

$\text{E}_1\text{-FAD}$  (NADH dehidrogenaza)

$\text{E}_2\text{-Fe(III)}$  (forma oxidată a proteinei Fe neheminic)

$\text{Cit.b(III)}$  (forma oxidată a citocromului b), etc.

Din schema pe care am arătat-o mai sus rezultă că în timpul transportului de electroni de la substrat la oxigen, la trei nivele se eliberează ATP.

Metabolismul glicolitic ca parte a metabolismului energetic este activ în absența oxigenului. Glicoliza a putut fi reconstituită în soluții din enzime purificate și cofactori care in vitro pot îndeplini aproximativ aceleași funcții care le îndeplinesc în celula vie.



Calea aerobă a vieții folosește un proces de conservare a energiei denumit proces de fosforilare oxidativă, care deocamdată nu a putut fi reconstruit în soluții. Aparent, așa cum am arătat și mai sus, pentru procesul de fosforilare oxidativă, este necesară o organizare structurală a enzimelor constitutive. Această structură este conservată și adăpostită în mitocondrii. Relația structură-funcție în cazul mitocondriei și a procesului de fosforilare oxidativă, are un grad de complexitate, care deocamdată cu mijloacele pe care știința contemporană le are la dispoziție nu a putut fi clarificat.

Arhitectura de bază chimică a catenei transportoare de electroni, sub forma de catalizatori și de complexe de catalizatori, pare să fie universală pentru mitocondriile din toate țesuturile animale. Cu toate acestea există deosebiri în detaliile organizării lanțului transportor de electroni în diferite țesuturi și la diferite specii de animale. Astfel  $\alpha$ -glicerofosfat dehidrogenaza este asociată cu lanțul transportor de electroni al mitocondriilor din mușchiul scheletic, dar nu este asociată cu lanțul transportor din inimă.

Raportul dintre citocromul a și citocromul b și numărul de molecule de citocrom c sau de NADH sau de coenzimă Q pe lanț respirator variază în funcție de sursa mitocondriilor.

Studii electron microscopice efectuate pe un număr important de sisteme mitocondriale și pe aceleași

sisteme din microorganisme, au arătat un aranjament unitar, invariabil a particulelor asociate cu funcția de transfer de electroni.<sup>(522)</sup> Aceste particule au o poziție asemănătoare și o formă și orientare asemănătoare, indiferent de origine. Si această constanță a formei și localizării este un simbol al unei unități morfologice precise în care este închis lanțul transportor de electroni. Complexele din lanțul respirator sînt orientate pentru cuplarea fluxului de electroni cu sinteza de ATP și mecanismul acestei orientări depășește unele mici detalii modificate ale lanțului respirator întîlnite la diferite specii.<sup>(523)</sup>

O demonstrație deosebit de strălucită a caracterului particulelor transportoare de electroni a dat-o Mahler<sup>(525,526)</sup> care comparînd particulele transportoare de electroni din celule de drojdie cu particule transportoare de electroni de la mutante de drojdie cu deficit în componente citocromice, observă că absența citocromilor de la celulele mutante nu se reflectă în particulele transportoare de electroni. Acestea au același loc și aceleași proprietăți generale ca și celulele normale. Leziunile rezidă în sinteza grupării heminice și nu a componentei proteice și de aceea în realitate celulele mutante sau mai bine zis lanțul respirator al acestor celule conțin numai apoproteine și nu citocromi compleți.

Menționăm și faptul că Chance propune un lanț transportor de electroni mitocondriali care nu admite

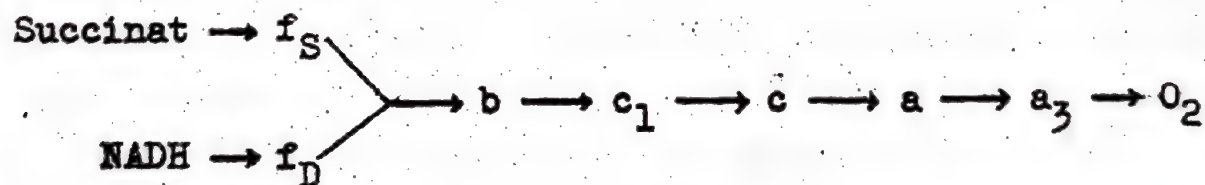


existența celor patru complexe și care nu include coenzima Q, Fe neheminic și Cu în calitate de componente ale catenei respiratorii și care nu admite existența a mai mult de o moleculă de citocrom b și a, pentru fiecare catenă respiratorie.

Lanțul transportor de electroni postulat de Chance presupune existența citocromilor ca monomeri în lanțul respirator capabili să reacționeze direct unul cu celălalt.

Redăm mai jos schema lanțului respirator postulat de Chance<sup>(523)</sup> din care se vede existența unei molecule din fiecare componentă inserată în schemă.

În schemă, cu  $f_D$  este notată flavoproteina fără Fe și cu activitate NADH-dehidrogenază; iar cu  $f_S$  este notată flavoproteina fără Fe cu activitate succin dehidrogenază.



Formularea lanțului transportor de electroni dată de Chance nu este acceptată de o bună parte din cercetătorii din acest domeniu. Precizăm încă odată că cea mai mică subunitate din lanțul transportor de electroni care a putut fi izolată fără pierderea activității enzimatice este complexul. Dacă complexul este mai departe fracționat în componentele proteice, se pierde ac-

tivitatea.

O serie de lucrări recente, arată că mitocondriile intacte izolate, pot suferi două tipuri de modificări ultrastructurale :

- modificări ultrastructurale pasive cauzate de modificări în presiunea osmotică a mediului în care sînt suspendate mitocondriile,

- modificări ultrastructurale active, dependente de activitatea catenei respiratorii.

Modificările ultrastructurale implică în primul rînd membrana mitocondrială internă și matricea, și constau într-o strîngere sau într-o extindere a compartimentului intern, însoțite de modificări în configurația membranei interne. (527,528,529,530)

Este bine cunoscut faptul că procesul de transfer de energie în mitocondrie, este însoțit de modificări conformaționale ale membranei interne.

Buffa<sup>(531)</sup> remarcă două tipuri de modificări în mitocondriile tratate cu agenți decuplanți ai fosforilării oxidative și anume:

- modificări considerate fiziologice, observate la mitocondriile provenite din celule în condiții normale,

- modificări patologice.

Tratamentul cu decuplanți, duce la creșterea opacității mitocondriei, cu creșterea spațiilor intracriste și cu dispariția limitelor dintre membrana internă și matrice. Aspectul mitocondriei este similar cu



asa numitul aspect "condensat" descris de Hackenbrock,<sup>(527)</sup> Volumul mitocondriei scade. Decuplarea procesului de fosforilare oxidativă este asociată cu contracția sacului mitocondrial intern, format de membrana internă și matrice.

S-a observat că oxidarea succinatului are loc la nivelul suprafeței interne a membranei interne în timp ce citocromul c este accesibil preferențial pe o cale de pe suprafața externă a membranei interne. De asemeni s-a observat că azida reacționează cu citocrom oxidaza de pe suprafața matricială a membranei și că sistemul enzimatic responsabil pentru procesul de fosforilare este asociat cu aceeași suprafață a membranei. Pe această bază, se consideră că toate componentele lanțului respirator sînt orientate transversal în interiorul membranei.

Este de asemeni cunoscut faptul că suprafața externă și internă a membranei mitocondriale interne prezintă diferențe importante din punct de vedere chimic.

Studii electron micrografice ale membranei interne ca și studiile asimetriei densității celor două suprafețe ale membranei, demonstrează clar că cele două suprafețe ale membranei interne sînt intrinsec diferite și că există o asimetrie chimică în structura membranei mitocondriale interne. Această asimetrie structurală, împreună cu direcționarea funcțională, face să se presupună o asamblare asimetrică a consti-

tuenților macromoleculari ai membranei interne și să se aprobe ipoteza organizării vectoriale a componentelor lanțului oxidativ din interiorul membranei. (532)

Așa cum am văzut, procesul de fosforilare oxidativă și la fel cu acesta procesul de fosforilare fotosintetică, sînt descrise în literatură ca procese de fosforilare asociate cu transferul de electroni. Aceste procese sînt constituite din secvența a două tipuri de particule și anume, particule oxidoreducătoare adică  $2H$ ,  $H^-$  sau  $2e^-$  și particule formatoare de legături macroergice ( $\sim$ ) terminate cu formarea de adenzin trifosfat (ATP).

Enzimele și transportorii catalitici care canalizează aceste fluxuri în mitocondrii, cloroplaste și microorganisme, sînt astfel organizate încît există un grad variabil de cuplare între acestea.

Rezultatul final al cuplării dintre cele două fluxuri (de electroni și de energie) din procesul de fosforilare oxidativă din mitocondrii, este acela că paralel cu traversarea lanțului respirator de către fiecare pereche de electroni, se formează trei molecule de ATP din ADP și  $P_a$ . Acest cuplu reacțional poartă denumirea de fosforilare oxidativă și este specificat drept coeficient de P/O sau coeficient de P/2e cu o valoare limită de 3.



### Fosforilarea oxidativă.

Cuplarea procesului de fosforilare a ADP la respirația aerobă, a fost postulată pentru prima dată de Engelhardt<sup>(581)</sup> din Uniunea Sovietică, în perioada anilor 1930.

Prin lucrarea lui Belitzer<sup>(533)</sup> se sugerează că activitatea lanțului respirator este cuplată cu sinteza de ATP. Dovezi concrete și sigure în această direcție au fost aduse de Friedkin și Lehninger<sup>(534)</sup> în 1949, și ulterior de un număr important de alți cercetători.<sup>(535,536)</sup>

Prin cercetări efectuate pe mitocondrii izolate, s-a observat că aceste structuri catalizează oxidarea intermediarilor ciclului acizilor tricarboxilici și acizilor grași, și mai mult decât atât că acest proces este însoțit de fosforilarea oxidativă. Studii ulterioare au dus la concluzia că stoechiometria fosforilării oxidative (raportul P/O) este maximal 3; 2; și 1 cu substrate NADH dependente, succinat și respectiv ferocitocrom c.

În legătură cu metabolismul energetic al mitocondriilor, un număr de lucrări excelente au sintetizat o bogată activitate experimentală desfășurată în acest domeniu.<sup>(537,538,539,540)</sup> Procesul de fosforilare oxidativă este esențial în transformarea energiei oxido reducătoare din lanțul respirator în gruparea macroergică

a ATP. (541,542)

Mecanismul molecular și principiul acestui proces este încă necunoscut. Este în general acceptat astăzi faptul că enzima fosforilantă terminală a fosforilării oxidative este identică cu factorul  $F_1$  descris de Pullman<sup>(543)</sup> și Racker<sup>(544)</sup>. Pentru combinarea  $F_1$  cu membrana mitocondrială internă sînt necesari alți doi factori: unul<sup>(545)</sup> descris sub denumirea de factorul X; iar altul<sup>(546)</sup> descris sub denumirea de factorul  $CF_0$ .

Un preparat corespunzînd unui complex  $F_1 - X - CF_0$  este cunoscut sub denumirea de complex ATP-azic oligomicină sensibil.<sup>(547)</sup> Mecanismul în care energia oxido reducerii este transferată la sistemul  $F_1 - X - CF_0$  pentru sinteza de ATP reprezintă una dintre cele mai interesante probleme ale bioenergeticii.

Mitocondria are capacitatea să transforme energia oxido reducătoare direct în energia osmotică a acumulării de ioni fără participarea ATP și deasemeni poate transforma energia ATP în energie osmotică fără implicarea lanțului respirator.<sup>(538,548)</sup> De fapt procesul de transport ionic mitocondrial este intim legat de mecanismul de fosforilare oxidativă, concepție dezvoltată deosebit de rapid mai ales după lansarea teoriei chemiosmotice a procesului de fosforilare oxidativă de către Mitchell<sup>(549)</sup> în 1961.

Transferul de electroni în lanțul respirator reprezintă un proces care este organizat pentru a asi-



gura un transfer de energie. În legătură cu procesul de fosforilare oxidativă sînt cunoscute cîteva ipoteze principale ca:

- ipoteza chimică
- ipoteza chemiosmotică
- ipoteza conformațională
- ipoteza protonilor localizați

Ipoteza chimică a procesului de fosforilare oxidativă are ca model mecanismul enzimatic al oxido-reducerii conservatoare de energie catalizată de gliceraldehidă 3 fosfat dehidrogenaza în glicoliză și se bazează pe concepția transferului de energie printr-o serie de reacții consecutive avînd intermediari chimici comuni ce posedă legături macroergice.

Prin această ipoteză se consideră că transferul a doi echivalenți reduși de la un transportor al catenei respiratorii la altul din imediata apropiere duce la formarea unui derivat primar "bogat în energie" a unuia dintre transportori. Acesta ulterior reactionează cu ADP și  $P_a$  (pe o cale cu intermediari suplimentari) pentru a forma ATP.

Ideia de bază a acestei ipoteze este cuplarea chimică a două reacții și anume a unei reacții de oxido-reducere și a unei reacții de fosforilare.

Baza pentru forma actuală a ipotezei chimice a procesului de fosforilare oxidativă a fost dată în 1953 de către Slater.<sup>(550)</sup>

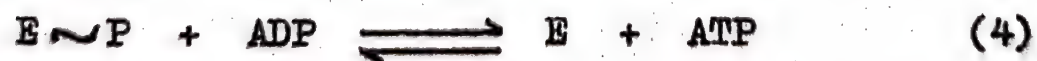
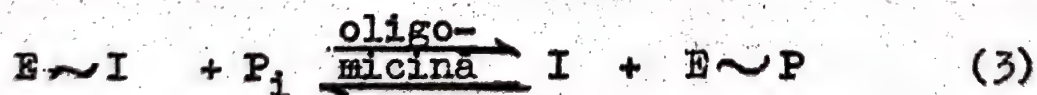
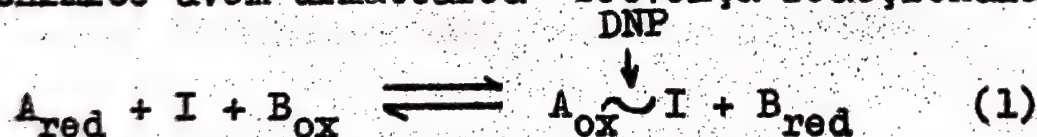
În formularea lui Slater se postulează exis-

tența unui intermediar bogat în energie, nefosforilat, înaintea introducerii fosfatului în secvența reacțională.

Prezența unei forme intermediare de energie în fosforilarea oxidativă care nu implică fosfatul și care mediază energia și spre alte funcții dependente de energie ale mitocondrii a fost confirmată și de Lee și Ernster<sup>(551,552,553,554)</sup>

Natura acestei forme de energie și mecanismul de formare a acesteia ca și folosirea ei rămân încă enigmatice.

Dacă se consideră A și B drept transportori de electroni, I ca factor intermediar de cuplare și E enzima generatoare de ATP, atunci conform ipotezei chimice avem următoarea secvență reacțională:



Se vede deci că în timp ce transportorul redus A este oxidat de către transportorul oxidat B în lanțul respirator se formează un compus macroergic  $A_{\text{ox}} \sim I$ , I este probabil un compus de natură proteinică.

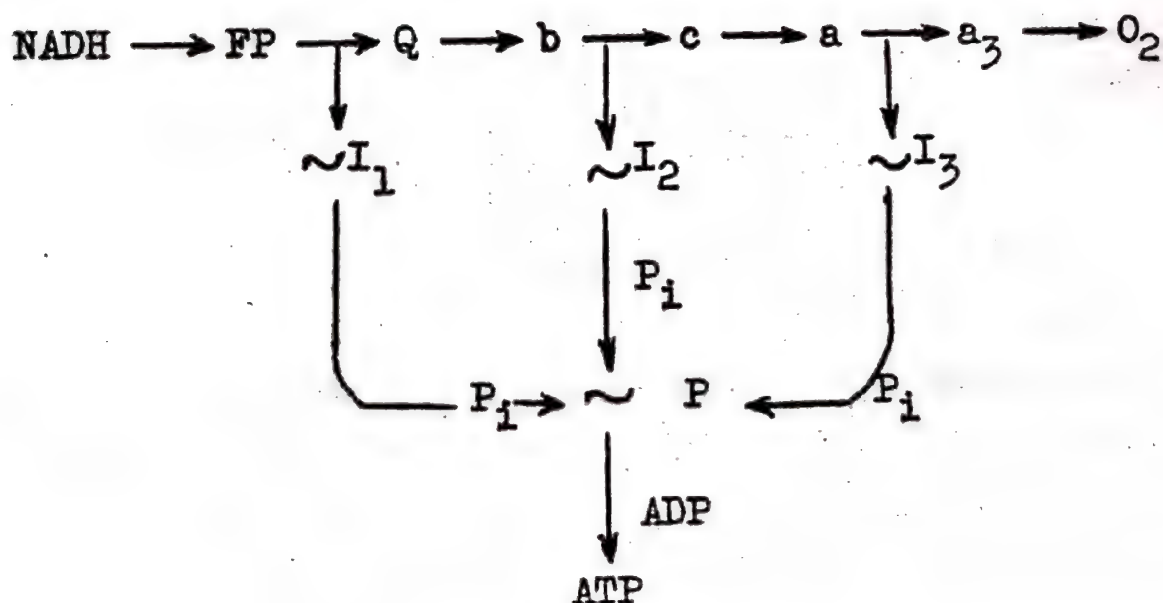


Apoi  $A_{ox}$  este înlocuit cu E în formarea complexului  $E \sim I$ .

În următoarea reacție intervine fosfatul anorganic pentru a forma complexul  $E \sim P$  (fosfoenzimă) care este donatorul direct de P pentru ADP în formarea de ATP. Oligomicina blochează formarea complexului  $E \sim P$  (fosfoenzimă) iar 2,4-dinitrofenolul (DNP) provoacă scindarea complexului  $A_{ox} \sim I$  sau  $E \sim I$  cu regenerare de  $A_{ox}$  și I sau de E și I.

Activitatea ATP-azică este reprezentată de suma reacțiilor (4), (3) și (2) urmată de acțiunea 2,4-dinitrofenol. Schimbările  $P_i$ -ATP și ADP-ATP sînt probabil catalizate de reacțiile (2) la (4) și de reacția (4) respectiv. (555)

Mecanismul de fosforilare oxidativă este redat după teoria cuplării chimice conform schemei de mai jos:



Conform acestei scheme la fiecare loc de conservare de energie se generează intermediari macroergici. O enzimă E este postulată în colectarea grupărilor fosfat macroergice din cele 3 locuri din lanțul respirator și le donează apoi ADP cu formarea de ATP.

Teoria cuplării chimice a procesului de fosforilare a ADP cu procesul de oxidare a  $H^+$  în lanțul respirator nu reușește să demonstreze existența complexului  $A_{ox} \sim I$  bogat în energie și nici felul în care conform acestei teorii se poate justifica dependența de structura membranei mitocondriale interne a acestui proces. De asemenea această teorie nu explică fluxul de protoni și alte mecanisme de transport din mitocondrii asociate respirației celulare. De asemenea nici mecanismul decuplării fosforilării oxidative cu decuplanți de tipul DNP nu este suficient de clar explicat.

#### Ipoteza chemiosmotică

Această ipoteză a fosforilării oxidative și fotosintetice a fost dată de Mitchell în 1961 și se bazează pe conceptul oxidoreducerii direcționale cuplate cu reversibilitatea activității unei ATP-aze, anizotropic legată de membrană cu ajutorul unui gradient electrochimic de proteină transmembranară.<sup>(549)</sup> Ipoteza se bazează pe organizarea anizotropică a componentelor lanțului respirator într-o astfel de manieră încât respirația creiază un flux de protoni transmembranari. Acest efect se realizează prin organizarea de transpor-



tori de hidrogen și electroni intermitenți în "noduri de legătură"(556,557) care corespund locurilor de cuplare din ipoteza chimică.

Mitchell(557) arată că obiectul ipotezei chemiosmotice este de a explica cuplarea dintre oxidoreducere și fosforilare fără ca să ~~asume~~ existența unor intermediari chimici comuni pentru procesul de oxidoreducere și de fosforilare.

Sistemul chemiosmotic constă din patru părți de bază care corespund la patru postulate și anume:

1. Un sistem ATP-azic , proton translocator.
2. Lanțul respirator proton translocator
3. Sistemul de difuzie și schimb, care cuplează translocarea de protoni cu aceea de anioni și cationi
4. Membrana de cuplare ion-impermeabilă din care rezidă și sistemele (1,2,3).

Ipoteza postulează existența a două sisteme ATP-azice reversibile denumite ATP-aza I și ATP-aza II care pot transloca 1 și respectiv 2 protoni pe mol de ATP hidrolizat.

Cel mai activ sistem ATP-azic în mitocondrii și cloroplaste(557) este ATP-aza II.

După această teorie o ATP-ază reversibilă și anizotropică localizată în membrana mitocondrială acceptă apa pentru hidroliza ATP, sub formă de protoni (nu însă hidroxili) de pe o suprafață a membranei și hidroxili ( nu însă protoni) de pe cealaltă suprafață a membranei.

Membrana conține transportori care cuplează difuzia electroneutrală a  $H^+$  cu difuzia cationilor și difuzia  $OH^-$  cu difuzia anionilor. Prin aceste fapte, teoretic se poate cupla activitatea lanțului respirator cu sinteza de ATP pe calea unui gradient electrochimic de protoni ("forță protonomotrice") fără implicarea unor intermediari macroergici primari. În acest mod ipoteza chemiosmotică, presupune o cuplare fizică între respirație și fosforilarea oxidativă.

În analogie cu forța electromotrice, forța protonomotrice reprezintă deosebire în pH și potențialul de membrană determinată de activitatea ATP-azei translocatoare de protoni și de activitatea lanțului oxidoreducător din membrană.

Cuplul dintre procesul de oxido-reducere și fosforilare poate fi descris sub forma unui flux de protoni care leagă ATP-aza și sistemul oxidoreducător la o forță protonomotrice de circa 250 mV.

Deși, ipoteza chemiosmotică pare să aibă mai mult suport experimental decât ipoteza chimică, totuși aceasta conține o serie de neclarități. Astfel, o transformare a energiei electrice în energie chimică așa cum este postulată de Mitchell<sup>(558)</sup> nu a fost niciodată demonstrată pe sisteme model biologice.

Cea mai slabă parte a ipotezei lui Mitchell, constă în explicarea reversibilității activității ATP-azei. După această ipoteză ar rezulta că molecula de ATP-ază este specific și deosebit de fin organizată în interiorul



membranei mitocondriale.

Prin ipoteza chemiosmotică, sistemul ATP-azic al mitocondriilor și cloroplastelor, este cuplat cu sistemul oxidoreducător și deci cu lanțul respirator, prin intermediul unui flux de protoni. După această teorie nu există nici un fel de legătură chimică între aceste două sisteme.

#### Ipoteza conformațională

Încă în 1962 Margoliash<sup>(559)</sup> presupune posibilitatea existenței unor modificări conformaționale în structura proteinelor în timpul activității funcționale a acestora. King<sup>(560)</sup> remarcă diferențe semnificative în proprietățile optice ale formelor reduse și oxidate ale unor preparate particulate de citocrom b - c<sub>1</sub> și de succinat - citocrom c reductaza. El ajunge la concluzia că este foarte probabil că un transportor de electroni din lanțul respirator în stare redusă poate fi mult mai favorabil în ceea ce privește geometria sa spațială pentru transferul de electroni la componenta următoare din lanț. Favorabilitatea poate fi atribuită modificărilor din conformația proteinică, care plasează gruparea prostetică a componentei respective din lanțul respirator în imediata apropiere a partenerului următor din lanțul respirator.<sup>(561,562,563)</sup>

Astfel s-a arătat că în citocromul c, hemul este situat într-un spațiu al proteinei mărginit de patru  $\alpha$ -helixuri

paralele.

Se presupune că modificări conformaționale ale porțiunii proteice datorite oxidoreducerii pot aduce gruparea prostetică (hemul) a citocromului c, într-o poziție favorabilă transferului de electroni. După această ipoteză, se presupune că structura lanțului respirator suferă modificări reversibile care sînt sincrone cu starea de oxidoreducere. Această ipoteză vine în contradicție cu ipoteze care văd în lanțul respirator o structură statică și rigidă.

Boyer<sup>(564)</sup> aseamănă modificările conformaționale din proteinele musculare induse de către hidroliza ATP, cu modificările proteinelor din lanțul respirator în timpul procesului de fosforilare oxidativă. Se presupune că schimbări conformaționale în unele proteine (apoproteinele transportorilor de electroni) acompaniind oxidoreducerea pot reprezenta forța motrice a fosforilării oxidative.

O grupare carboxilică activată a fost postulată de Boyer<sup>(564)</sup> în calitate de intermediar bogat în energie format ca urmare a unor modificări conformaționale în transportorii din lanțul respirator.

Modificările redox induc modificări conformaționale în lanțul respirator <sup>(565)</sup> ca și în componenta proteinică a citocrom oxidazei.

S-au descris modificări în distribuția încărcăturilor electrice în membrana mitocondrială internă care însoțesc energizarea și de-energizarea, dar originea și natura acestor modificări este încă neclară.<sup>(568)</sup>



Perrniston<sup>(569)</sup> și Hackenbroock<sup>(570)</sup> consideră modificările structurale observate în diferite stări energetice ale mitocondriilor, drept o indicație a unui mecanism conformațional a procesului de fosforilare oxidativă.

Modificări în reacția de oxidoreducere și energetică din mitocondrii, induc modificări conformaționale în membrana acestora.<sup>(571)</sup>

Plasticitatea și motilitatea structurală a proteinelor direcționată conformațional cu ajutorul efectoarelor specifici, înlocuiește azi vechea opinie care vedea în proteine, inclusiv în cele din lanțul respirator unități imobile, fixe, statice.

Controlul conformațional este astăzi implicat în reglarea principalelor lanțuri metabolice, a unor enzime cu poziție centrală în activitatea unui lanț metabolic, cum sînt fosfo-fructokinaza din glicoliză, sau glutamat dehidrogenaza și izocitricodehidrogenaza din metabolismul oxidativ. Studii de fluorescență au confirmat ipoteza participării active a mecanismelor de reglare conformațională alosterică în sistemul transportor de energie, mitocondrial, în energizarea fragmentelor de membrană mitocondrială.

#### Ipoteza "protonilor localizați"

Principiul acestei ipoteze a fost postulat de Williams<sup>(572,573)</sup> In general această ipoteză postulează ca rezultat al oxidoreducerii în lanțul respirator, eliberarea de protoni care rămîn fixați într-un anumit sec-



tor al membranei.

Protonii astfel localizați furnizează forța motrice pentru sinteza de ATP prin diferite mecanisme, dintre care cel mai simplu pare a fi dehidratarea din apropierea centrului activ al ATP-azei cu formarea de  $H_2O^+$  din apă, în echilibru cu ATP, ADP și P-anorganic. (567)

Această ipoteză este în esență "chimică" dar diferă de diferitele variante ale ipotezei chimice, prin faptul că nu implică nici un fel de intermediari bogați în energie, iar parcursul oxigenului de la P-anorganic la apă în timpul fosforilării oxidative nu necesită implicarea de intermediari.

Ca și în ipoteza chemiosmotică a lui Mitchell și aci este punctată importanța eliberării de protoni în timpul oxidoreducerii.

Williams<sup>(574)</sup> arată că protonii localizați anizotropic livrează energie fluxului dependent de energie al ionilor prin membrana mitocondrială, fără a implica aci în sensul adevărat așa numitele "pompe ionice".

Mecanismul "protonilor localizați" nu implică modificări semnificative de pH în structura membranei, și nu creează un potențial de membrană. În schimb, postulează așa numitele potențiale limită de difuzie de fiecare parte a membranei mitocondriale.

Această ipoteză depășește unele molarități din ipotezele chimice și chemiosmotice, în primul rând prin faptul că presupune că protonii nu se deplasează în afara membranei până când nu s-a efectuat sinteza de ATP, ceea ce previne pierderi inutile de energie. De asemenea ipoteza



"protonilor localizați" nu implică o organizare deosebit de specifică a ATP-azei în membrană care este condiția esențială a teoriei chemiosmotice.

Din cele arătate pînă aci rezultă clar că între consumul de oxigen (respirație) și formarea de ATP, există o strînsă legătură. Această legătură demonstrează că respirația celulară este dependentă de prezența în mitocondrii a ADP și a fosforului anorganic și că deci consumul de oxigen este dependent și deci limitat de concentrația ADP și P-anorganic.

Respirația celulară este de asemeni dependentă de raportul  $\text{NAD}/\text{NADH}_2$  sau  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$ . Aplicînd legea maselor conform ecuației:

$$\frac{[\text{NADH}].[\text{FAD}].[\text{ADP}].[\text{P}]}{[\text{NAD}].[\text{FADH}_2].[\text{ATP}]} = K$$

vedem că respirația poate fi stimulată de exemplu, prin creșterea concentrației de ADP și P, efect observat cu deosebită claritate în activitatea musculară; și invers atunci cînd ATP este în exces, poate inhiba activitatea respiratorie.

O serie de date arată chiar, că la concentrații foarte mari de ATP, fluxul din lanțul respirator poate fi făcut reversibil. (reversibilitatea procesului de fosforilare oxidativă). Această autoreglare a lanțului respirator, poartă denumirea de "control respirator" reglat prin necesarul de energie.

Am văzut de asemeni că procesul de fosforilare

oxidativă reprezintă de fapt, un cuplu între procesul de fosforilare a ADP de către P-anorganic și procesul de transfer de electroni de la donatori la acceptori în lanțul respirator. Această cuplare așa cum am mai arătat, are loc la trei nivele și anume:

- în timpul oxidării NADH,
- în timpul oxidării citocromului b,
- și probabil în timpul oxidării citocromului c.

Astfel în cazul oxidării unui substrat în care acceptor primar de  $H^+$  este NAD, deci care este oxidat de o NADH dehidrogenază, se formează trei molecule de ATP pentru fiecare atom de oxigen care este redus pentru a forma o moleculă de apă.

În cazul oxidării succinatului, când etapa NAD este omisă, se vor forma numai două molecule de ATP pentru fiecare atom de oxigen care este redus.

Oxidarea unei molecule de citocrom c duce la formarea unei molecule de ATP, formarea de ATP trebuind să aibă loc în etapa dintre citocromul c și oxigen.

Experimental s-a putut demonstra că substratul este de asemenea factor limitant în procesul de fosforilare oxidativă. Astfel, dacă mitocondriile sînt păstrate în absență de substrat, toți transportorii de electroni din lanțul respirator devin oxidați.

În timpul oxidării substratului și a fosforilării cu care aceasta este cuplată, transportorii de electroni devin în stare redusă.



Pe baza datelor existente pînă în prezent, s-au putut stabili anumite raporturi stoichiometrice între diferiți transportori de electroni din lanțul respirator. Astfel s-a observat că citocromii și flavinele se găsesc în concentrații aproximativ egale, în timp ce piridin nucleotidele se găsesc în concentrații de circa 10 ori mai mari.

Din aceste date, ca și din diferite măsurători ale volumului mitocondrial, ca și a conținutului în proteine a mitocondriilor, s-a putut calcula numărul de ansambluri respiratorii pentru fiecare mitocondrie, și s-a putut aprecia că numărul acestora, deci numărul lanțurilor de transportori de electroni integrate, variază între 5000 și 10.000 pentru o mitocondrie.

Sintetizînd datele din literatură cu privire la procesul de fosforilare oxidativă, deci datele cuprinse în toate ipotezele cu privire la mecanismele de cuplare ale acestui proces, Loewy și Siekevitz,<sup>(575)</sup> prezintă o schemă pentru cuplarea transportului de electroni cu procesul de fosforilare.

În schema care urmează apar următoarele notări:

- A și B reprezintă transportorii de electroni
- X și Y sînt intermediari de cuplare ipotetici
- $P_a$  reprezintă fosforul anorganic,
- $P_a^{xx}$  este  $^{32}P$
- $A^xDP$  este ADP radioactiv.

În această schemă se recunosc patru etape :



Ideia centrală a acestei scheme, este că cuplarea dintre transportul de electroni și fosforilare cu care este asociat acest transport, are loc cu ajutorul unui intermediar, care este comun ambelor tipuri de reacție.

După această ipoteză se postulează că un transportor redus ( $\text{AH}_2$ ) reacționează cu transportorul învecinat în lanțul respirator (B) în prezența unei alte substanțe (X), care reduce pe (B) la ( $\text{BH}_2$ ). În acest timp, o legătură macroergică ( $\sim$ ) se formează între  $\text{BH}_2$  și X dând ( $\text{BH}_2 \sim \text{X}$ ) cu o cantitate de energie înmagazinată egală cu aceea pe care o găsim în ATP. Acest compus în etapa următoare reacționează cu un nou compus ipotetic (Y), formînd un intermediar macroergic ( $\text{X} \sim \text{Y}$ ). În etapa următoare P-anorganic intră în reacție, formînd ( $\text{Y} \sim \text{P}$ ) și eliberîndu-l pe (X).

Complexul macroergic  $\text{Y} \sim \text{P}_a$  se cuplează apoi cu ADP formînd în final ATP și eliberîndu-l pe (Y).

Complexul ( $\text{X} \sim \text{Y}$ ) este în acest mod un intermediar comun



atît pentru transportorii de electroni cît și pentru enzimele de fosforilare. Se vede din schemă că toate etapele secvenței reacționale sînt reversibile. Natura precisă a intermediarilor X și Y este necunoscută, s-ar putea să fie enzime fosforilate. S-a postulat ca în această schemă să intervină compuși ca "enzimă cu N activat legat" sau "enzimă cu histidină fosforilată legată".<sup>(575)</sup>

Nu se știe încă nici dacă compușii X și Y postulați în schemă pot fi aceeași în toate cele trei locuri de fosforilare din lanțul respirator.

Relații strînse există între procesul de fosforilare oxidativă și necesarul de energie al mitocondriei proprii pentru activitatea acestora.

Este de menționat că mitocondriile au un sistem activ de transport pentru diferiți ioni, deci ele necesită energie pentru acest transport. Formal, se consideră că ATP-ul generat în mitocondrii este singurul compus macroergic care este folosibil în transport. Totuși sînt date care arată că un intermediar macroergic pare să fie implicat aici, de natura compusului (X~Y) din figura prezentată mai sus.

Se știe că transportul și acumularea de ioni ca  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , sau  $K^+$  este însoțită de oxidare de substraturi și de generare de ATP, sau necesită adăugarea de ATP ca atare. S-a mai observat că dacă se adaugă oligomicină, adăugarea de ATP nu mai influențează transportul de ioni,

deși oxidarea substratelor este blocată, deci, în aceste condiții transportul de ioni nu este afectat.

Dar întrucât se știe că transportul de ioni necesită energie, este de presupus că în prezența oligomicinei, când nu se formează ATP, se poate forma totuși un intermediar macroergic ca rezultat al oxidării substratului, și se pare că acest intermediar este cel de tip  $(X \sim Y)$  care poate fi făcut răspunzător și pentru transportul de ioni și acumularea acestora. De aici se poate deduce că pentru necesități energetice proprii (inclusiv transport) mitocondria folosește compusul  $(X \sim Y)$ , iar în condițiile în care energia este livrată restului celulei, acest compus  $(X \sim Y)$  poate fi fosforilat iar apoi folosit în generare de ATP. În acest mod ATP-ul este pus la dispoziția celulei de către mitocondrie.

Pe baza acestei scheme s-ar putea explica și efectul 2,4-dinitrofenolului. Acest compus a fost cunoscut o vreme îndelungată ca decuplant al procesului de fosforilare oxidativă, și se știe deci că în prezența unor concentrații foarte mici ale acestui compus ( $10^{-4}$  -  $10^{-5}$  M) în prezența de substrat și ADP, respirația și deci consumul de oxigen merge cu capacitate nemodificată sau chiar crescută, dar nu are loc nici un fel de fosforilare. 2,4 - dinitrofenolul este și un activator al ATP-azei mitocondriale, hidrolizând P-anorganic din ATP. Toate aceste efecte ne fac să postulăm faptul că dinitrofenolul (DNP), acționează cauzând ruptura complexului



(X~Y) și deci eliberând X și Y, iar că în aceste condiții (X~Y) nu mai poate acționa ca acceptor de P anorganic în formarea de ATP.

Oligomicina acționează în etapa 3-a din schemă de mai sus, în sensul că (X~Y) care se formează ajută transportul de ioni, dar oligomicina blochează capacitatea de reacție a acestui compus cu P anorganic și deci blochează posibilitatea formării de ATP. (575)

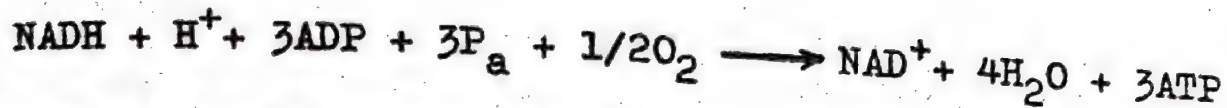
Se postulează faptul că circa 90% din energia eliberată în timpul digेरării substanțelor alimentare, are loc în procesul de transport de electroni.

Chance (576, 577) Klingenberg (578) și Andreoli (579) au stabilit posibilitatea existenței unui transfer invers de electroni intramitocondrial și care este dependent de energie.

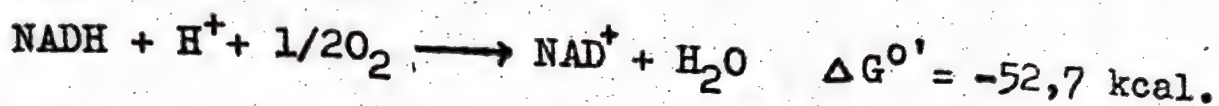
Law (580) demonstrează reducerea dependentă de ATP, a NAD în particulele submitocondriale fosforilante. Dacă aceasta este folosită împreună cu reacția oxidativă generatoare de energie a NADH de către fumarat, o reducere rapidă a NAD este posibilă în prezența succinatlui.

S-a izolat un factor de natură proteinică implicat în reducerea ATP-dependentă a NAD de către succinat în particulele submitocondriale. (579)

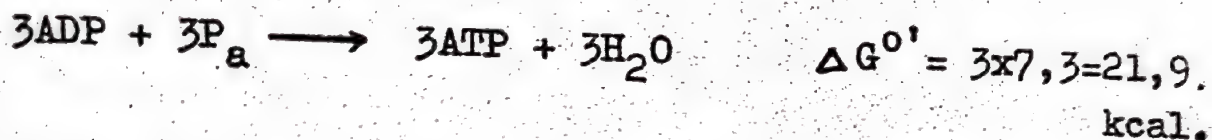
Factorul purificat este termolabil și stimulează fosforilarea cuplată cu oxidarea succinatlui sau a NADH ca și schimbul  $^{32}\text{P}$ -ATP, de asemenea are și activitate ATP-azică. Reacția generală a fosforilării oxidative poate fi scrisă sub forma:



care poate fi despărțită în componenta exergonică:

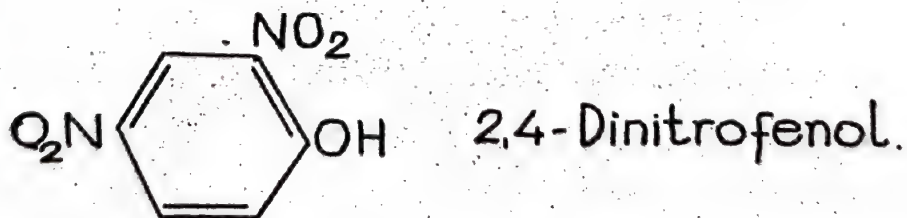


și în componenta endergonică:



Agenti decuplanți ai procesului de fosforilare oxidativă.

Loomis și Lipmann<sup>(582)</sup> au observat că fosforilarea oxidativă poate fi disociată de respirație cu ajutorul unor agenți chimici specifici ca 2,4 Dinitrofenolul și alți halo- și nitrofenoli.

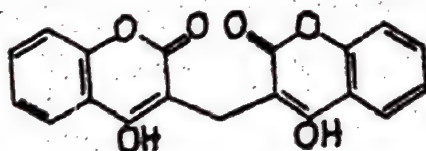


În prezența acestor agenți respirația unui țesut poate continua normal, sau poate fi chiar stimu-

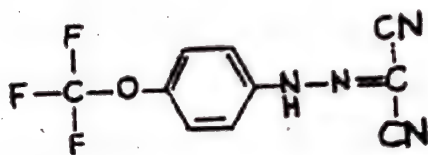


lată ,dar aceasta în lipsa fosforilării ADP la ATP. Pentru acest motiv acești agenți au fost denumiți "agenți decuplanți".

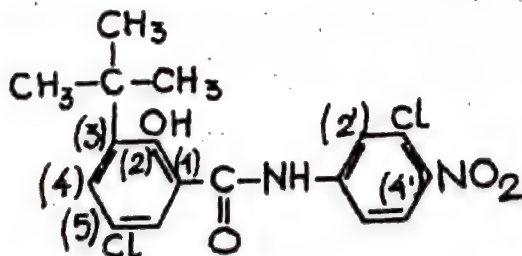
Se cunosc astăzi numeroase substanțe care au efect decuplant asupra fosforilării oxidative. Dintre aceștia amintim:



Dicumarol



Carbonilcianid p-triflorometoxifenilhidrazona.



5-cloro-3-butil-2'-cloro-4'-nitrosalicilanilida.

Marea majoritate a agenților decuplanți sînt substanțe liposolubile ce conțin un ciclu aromatic și o grupare acidă ionizabilă. Acești agenți nu decuplează fosforilarea glicolitică și nici alte reacții.

Racker<sup>(583)</sup> consideră că 2,4-dinitrofenolul și alți agenți decuplanți disociază procesul de fosforilare de procesul de transfer de electroni.

Așa cum am arătat mai înainte se postulează că agenții decuplanți se unesc cu compușii intermediari bogați în energie ce se formează în timpul trecerii electronilor prin lanțul respirator, în vederea cuplării cu procesul de fosforilare a ADP de către P-anorganic a acestui proces.

Folosind decuplanți ai procesului de fosforilare oxidativă, deci eliberînd transportul de electroni de sinteza de ATP, se pot studia capacitățile maxime ale enzimelor de dehidrogenare și a celorlalte enzime din catena respiratorie și de asemeni se poate aprecia rolul limitant al diferitelor **substrate** în determinarea capacității respiratorii celulare. (584, 585, 586)

#### Permeabilitatea membranei mitocondriale. Transportul de ioni dependent de respirația mitocondrială.

Membrana mitocondrială externă este relativ permeabilă pentru compușii cu **greutate** moleculară mică iar membrana internă este permeabilă pentru apă, molecule neutre mici ca, urea și **glicerolul**, pentru acizi grași cu catenă carbonică scurtă.



Membrana internă mitocondrială este considerată impermeabilă pentru cationii de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , sau  $\text{Mg}^{2+}$  sau pentru anioni ca:  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , zaharuri ca zaharoza și pentru mulți amino acizi. De asemenea membrana internă mitocondrială este impermeabilă pentru NAD și NADP, NADH și NADPH, pentru nucleozide-5-monofosfat, di- și tri-fosfat și pentru CoA și esterii acestora.

Compartimentul mitocondrial intern însă, conține un set complet din aceste nucleozide și coenzime care este fizic separat și funcțional este distinct de cele extramitocondriale sau citoplasmaticice.

S-a demonstrat faptul că membrana internă mitocondrială conține o serie de permeaze sau transportori care efectuează transportul unor metaboliți specifici prin membrană. Acești transportori se aseamănă într-o oarecare măsură cu enzimele, în sensul că sînt specifici pentru anumite substanțe, au grade de saturație diferite în funcție de concentrația substanțelor de transport și pot fi inhibați specific.

În mitocondriile de ficat de șobolan s-au identificat transportori specifici pentru ADP și ATP, pentru fosfat și pentru unii intermediari ai ciclului Krebs, ai acizilor tricarboxilici.

Astfel transportul de ADP și ATP este inhibat specific cu Atractylozidă, transportul de fosfat este inhibat cu mersalyl, transportul de succinat sau de malat izocitrat, citrat și cis-aconitat este inhibat cu n-butilmalonat iar transportul de glutamat este inhibat cu

4-hidroxi glutamat. Se vede deci că transportul de ADP și ATP prin membrana mitocondrială nu se face prin difuzie simplă ci cu ajutorul unor transportori specifici inhibați de atractylozidă-un glicozid toxic obținut din plante mediteraniene-Atractylis gummifera-.

Ca și oligomicina nici atractylozida nu inhibă fosforilarea oxidativă a ADP intramitocondrial, deși sînt inhibitori ai procesului de fosforilare oxidativă inhibînd transportul ADP și ATP de către un transportor special prin membrana mitocondrială.

Se pare că acest transportor din membrana mitocondrială permite intrarea unei molecule de ADP în mitocondrie numai în condițiile în care o moleculă de ATP iese afară din această organelă subcelulară. Acest schimb de moleculă pentru moleculă poartă denumirea de difuzie de schimb.

Transportul de ADP și ATP din membrana mitocondrială este foarte specific și nu poate transporta alți XTP, sau XDP ca GDP, GTP, CDP, CTP etc.

Sistemele de transport, al ionilor de fosfat și al ionilor de hidroxil prin membrana internă, este inhibat de către medicamentul mercurial-mersalyl. Sînt o serie de indicații care arată că transportorul de ADP și transportorul de fosfat sînt legate funcțional. S-au identificat 2 transportori pentru intermediarii din ciclul Krebs. (587) Un transportor este specific pentru succinat și pentru malat, iar cel de al doilea este specific pentru





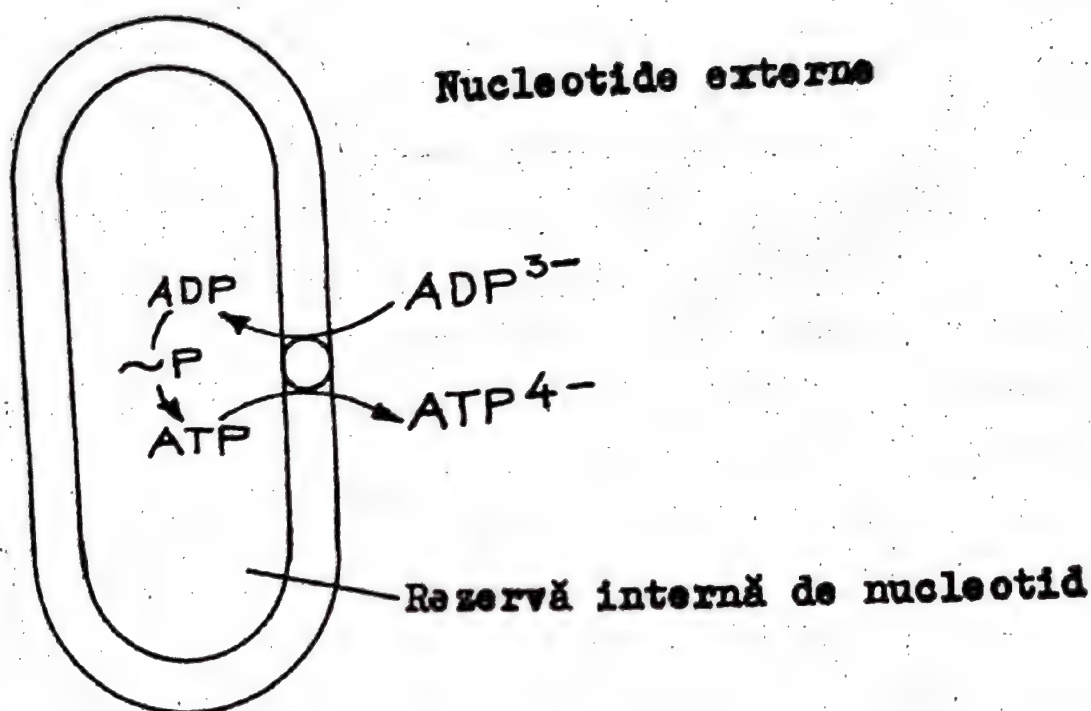
citrat, cis-aconitat și izocitrat. Acesta din urmă necesită prezența atât a ionilor de fosfat cât și a malatului. Cei doi transportori inhibați de n-butilmalonat au fost identificați în mitocondriile de ficat și de rinichi, dar nu au fost găsiți în mitocondriile mușchilor aripilor de la insecte.

Aceste date demonstrează că fosforul anorganic și ADP traversează membrana mitocondrială înaintea oxidării și de asemenea se demonstrează că reacțiile ciclului Krebs ca și transportul de electroni și fosforilarea oxidativă au loc în compartimentul intern sau pe suprafața internă a membranei interne și că ATP format în acest proces părăsește apoi compartimentul intern pentru a ajunge în citoplasmă.

Conținutul în ATP și ADP intramitocondrial este separat de cel citoplasmatic, dar acestea comunică între ele, prin sistemul de transportori sensibili la atractylozidă.

Lehninger dă următoarea figură care explică schimbul de ADP și ATP prin membrana mitocondrială internă prin mijlocirea transportului de ATP.

Transportorul este inhibat de concentrații foarte mici de atractylozidă, compus ce se aseamănă structural cu ATP.



Există deci un schimb complex de intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici și de fosfat între citoplasmă și de compartimentul intramitocondrial. Această compartimentare a intermediarilor joacă un rol important în integrarea și controlul metabolismului glicolitic și respirator, ca și în alte compartimente metabolice în care participă ciclul acizilor tricarboxilici și în special în gluconeogeneză.



Mitocondriile intacte sînt capabile sã acumuleze o serie de cationi bivalenți din mediile în care sînt suspendate, în timpul respirației. Dacă ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  sînt adăugați la mitocondriile izolate, de rinichi de șobolan care respiră într-un mediu cu fosfat,  $\text{Ca}^{2+}$  este foarte rapid acumulat din mediu. Dacă la acest sistem se adaugă 2,4-dinitrofenol sau inhibitori respiratori ca cianura, acumularea de  $\text{Ca}^{2+}$  este prrită ceea ce demonstrează dependența de energia eliberată în respirație a acestui proces.

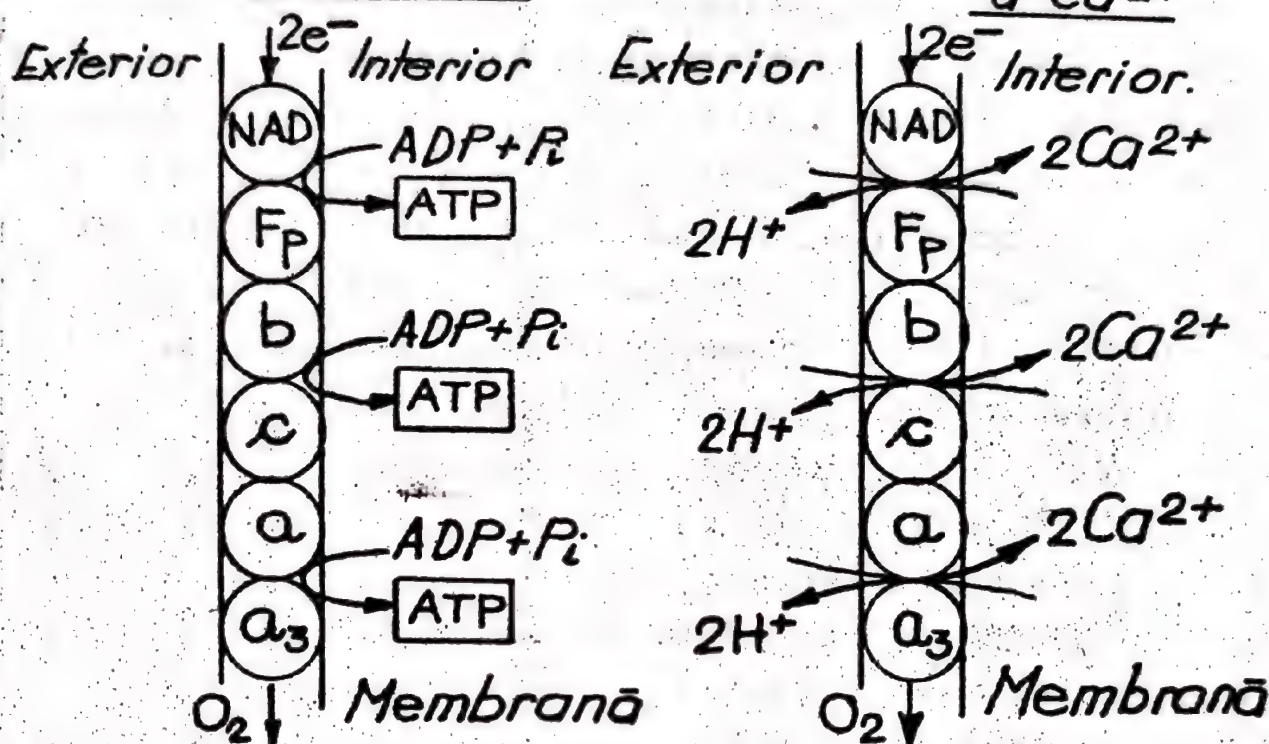
Rossi și Lehninger<sup>(588,589,590)</sup> au arătat că acumularea de  $\text{Ca}^{2+}$  este stoechiometric legată de transportul de electroni. Pentru fiecare pereche de electroni care trec de la NADH la oxigen, cinci ioni de  $\text{Ca}^{2+}$  se acumulează din mediu, circa 1,7 pentru fiecare etapă conservatoare de energie. O dată cu acumularea de  $\text{Ca}^{2+}$  stoechiometric se acumulează și P-anorganic. Deci ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  și fosfatul se acumulează în raportul în care aceștia sînt găsiți în structura hidroxiapatitei sau a osului mineral.

Din figurile expuse în pagina următoare se vede modul în care fosforilarea ADP și acumularea de cationi sînt procese alternative în timpul transportului de electroni.<sup>(590)</sup>

Fosforilarea oxidativă      Acumularea oxidativă

a A.D.P.-ului

a  $Ca^{2+}$



Lehninger<sup>(591)</sup> arată că dacă se acumulează  $Ca^{2+}$  în acest mod, fosforilarea oxidativă a ADP nu mai are loc. Acestea sînt procese alternative, iar energia rezultată din transportul de electroni poate fi folosită pentru acumularea de  $Ca^{2+}$  sau pentru formarea de ATP, dar nu pentru ambele procese simultan. Ioni de  $Sr^{2+}$  și de  $Mn^{2+}$  se acumulează într-o manieră asemănătoare cu acumularea  $Ca^{2+}$  în mitocondrie, nu însă ioni de  $Mg^{2+}$  care nu se acumulează și nu traversează membrana mitocondrială.

Capacitatea mitocondriilor de a acumula și de a elibera  $Ca^{2+}$  și fosfat poate fi asemănătoare funcției de calcifiere biologică, ca și sechestrării  $Ca^{2+}$  în timpul relaxării mușchilor roșii.

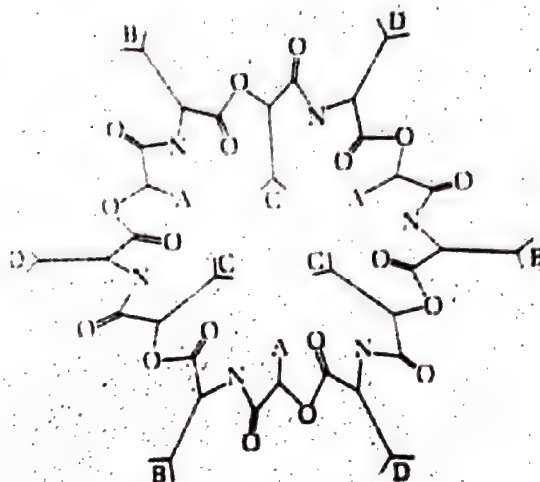


Faptul că s-a observat că pentru fiecare pereche de electroni ce trece prin lanțul respirator se acumulează câte doi ioni de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  sau  $\text{Mn}^{2+}$  la fiecare loc de conservare de energie, și dacă fosfatul este în mediu și se acumulează odată cu cationii, s-a considerat că există un raport "superstoichiometric" între acumularea de  $\text{Ca}^{2+}$  și transportul de electroni, și că acest proces are loc în prezența unor concentrații mari de cloruri, ioduri, bromuri și tiocianat, dar nu și în cazul în care aceste săruri sunt înlocuite cu zaharoza.<sup>(590)</sup>

Alte cercetări au arătat că adăugarea de mitocondrii proaspăt preparate la un mediu conținând săruri nepermeabile ca  $\text{NaCl}$ , produce emiterea de ioni  $\text{H}^+$  și alte modificări acido-bazice, modificări ce pot condiționa răspunsul mitocondrial la adăugarea de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Cationii monovalenți de tipul  $\text{K}^+$ , cation ce se găsește în concentrație mai mare în citoplasma celulară, în mod normal nu se acumulează în mitocondrii întrucât membrana mitocondrială nu este permeabilă pentru  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , sau alți cationi monovalenți.

Totuși Pressman<sup>(592)</sup> găsește că o serie de substanțe care sînt cunoscute ca inhibitori sau cu efect decuplant în procesul de fosforilare oxidativă și în special antibioticele decuplante ca valinomycina și gramicydina, pot cauza acumularea de ioni de  $\text{K}^+$  de către mitocondriile izolate.

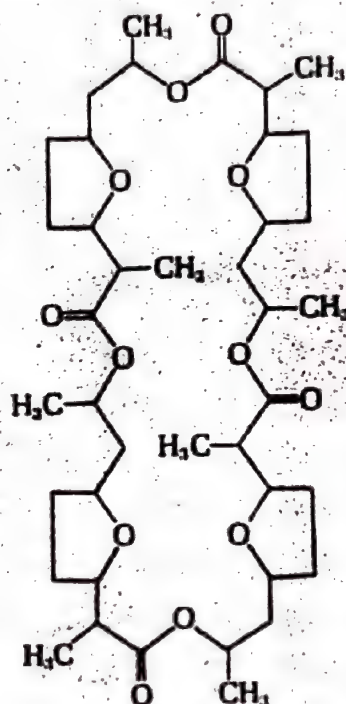


- A = L-Lactat  
B = L-Valina  
C = D-Hidroxiizovalerat  
D = D-Valina

Cea mai mare parte din antibioticele ionofore care induc trecerea  $K^+$  prin membrana mitocondrială au o structură circulară cu un centru gol care poate prinde  $K^+$ . Valinomycin favorizează acumularea  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ , iar gramicidina favorizează atât acumularea de  $K^+$  cât și de  $Na^+$ ,  $Li^+$ ,  $Rb^+$  și  $Cs^+$ . Dacă  $K^+$  este pompat în mitocondrii de către aceste antibiotice, mitocondria nu mai poate fosforila ADP.

Un alt antibiotic, și anume nonactina de asemenea induce penetrarea  $K^+$  dar nu și a  $Na^+$  în mitocondrii. Acest antibiotic a fost recent cristalizat sub formă de sare de  $K^+$ .





Valinomicyna și gramicydina sînt toxice pentru mitocondrii deoarece acestea determină mitocondria să folosească energia pe care normal o utilizează în fosforilarea oxidativă, pentru pomparea spre interior a  $K^+$  care este urmată de efluxul pasiv și rapid al acestui ion.

Acumularea de cationi bivalenți de  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  sau de cationi monovalenți  $K^+$ ,  $Na^+$  (în prezență de gramicydină și valinomicynă) are o proprietate semnificativă și anume aceea că, în timp ce acești cationi se acumulează, un număr echivalent de ioni  $H^+$  sînt emiși din

mitocondrii în mediu.

Transportul de electroni în direcția naturală a fluxului din lanțul respirator, (593)(594) se pare că duce la emiterie de  $H^+$ . Dacă în mediu se găsește succinat și respirația este blocată cu amital sau rotenonă, (595) atunci fluxul de electroni ia calea inversă și  $H^+$  sînt luați de către mitocondriile din mediu în timpul transportului de electroni, de la succinat la NAD.

#### Efectul Pasteur și efectul Crabtree.

Dacă o celulă care poate folosi facultativ glucoza atît aerob cît și anaerob este obligată să folosească acest substrat în condiții anaerobe, capacitatea acestei celule de a degrada glucoza și de a forma acid lactic depășește de multe ori aceeași capacitate pe care o au aceleași celule în condiții aerobe.

Se știe că glicoliza anaerobă are un bilanț energetic de numai două molecule de ATP pentru o moleculă de glucoză metabolizată, în timp ce oxidarea totală a unei molecule de glucoză duce la formarea de 38 molecule de ATP.

Celulele facultative puse în condiții de anaerobioză sînt obligate să consume cantități mari de glucoză. Dacă la o astfel de suspensie de celule este permis accesul oxigenului, cantitatea de glucoză folosită se reduce, consumul de oxigen începe imediat iar formarea de lactat scade foarte mult. În locul transformării





glucozei în două molecule de lactat, proces întâlnit în glicoliza anaerobă, în timpul respirației celulare oxidarea glucozei are loc după ecuația:



Acest fenomen de inhibare a consumului de glucoză și de scădere a acumulării de lactat care este observat

în timpul creșterii capacității respiratorii poartă denumirea de efect Pasteur. Acest efect a fost observat pentru prima oară de către Pasteur la celulele de drojdie și poate fi explicat prin faptul că în prezență de  $\text{O}_2$  are loc o degradare totală a glucozei până la nivel de  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  cu un bilanț energetic maximal pozitiv, care face ca aportul în energie dat de glicoliză să devină inutil.

Efectul Pasteur este o proprietate generală a tuturor celulelor facultative inclusiv a celulelor animale.

În glicoliza anaerobă, lactatul se formează din piruvat pe seama NADH generat în reacția gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza. Reacția formării de lactat este catalizată de lactat dehidrogenaza (LDH). Dacă această enzimă nu funcționează, NAD nu se regenerează iar glicoliza este blocată.

În condiții de aerobioză, NADH format în reacția glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenazei nu mai este oxidat în reacția LDH ci este oxidat prin lanțul respirator, care are o afinitate pentru NADH mai mare decât

IDH. Piruvatul în aceste condiții este oxidat direct la acetil CoA și  $\text{CO}_2$ .

Se știe că atât în respirație cât și în glicoliză ADP și P-anorganic sînt factori limitanți. Efectul Pasteur și efectul Pasteur invers, denumit și efect Crabtree care de fapt este inhibiția respirației de către glicoliză pot fi explicate prin concurență pentru ADP și P-anorganic.

Efectul Crabtree a fost observat cel mai frecvent în celulele canceroase în care se știe că există o glicoliză crescută și o capacitate respiratorie scăzută.

#### Reglarea hormonală a respirației.

Respirația celulară este strîns legată de celelalte căi metabolice. Ea nu trebuie privită aparte de restul celulei, ca un sistem care într-un fel ar putea fi îngrădit și separat de restul mitocondriei sau celulei. Componente din toate compartimentele metabolice pot influența respirația tisulară; iar procese diferite metabolice ca respirația și sinteza, inclusiv fotosinteza plantelor verzi folosesc adesea aceleași mijloace și reacții.

Respirația celulară așa cum am văzut, este reglată de cantitatea și calitatea enzimelor lanțului respirator, de integritatea membranelor mitocondriale în care acestea sînt localizate de capacitatea de sinteză a acestor enzime și de calitatea și cantitatea cofactorilor

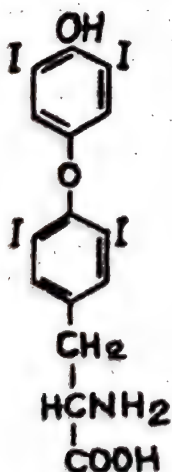


necesari în activitatea lor.

Respirația celulară este dependentă de aportul de substrat ce pot fi supuse reacțiilor de dehidrogenare. Respirația celulară este dependentă de raportul  $[ATP] / [ADP] [P_a]$ . De asemenea respirația celulară este reglată și de activitatea hormonală. Dacă glanda tiroidă la mamifere pierde total sau parțial capacitatea de a produce hormoni proprii (tiroxina și triiodotironina) consumul de oxigen scade semnificativ, iar activitatea metabolică generală marchează de asemeni o încetinire.

### Hormoni tiroidieni

*Tiroxina*



*3,5,3'-Triiodotironina*

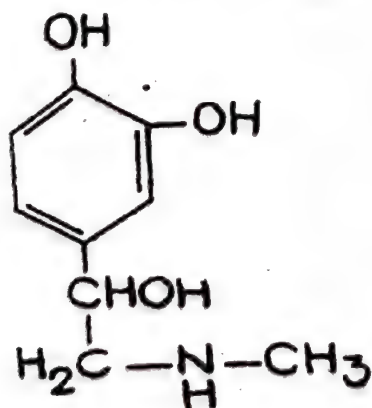


Dacă se administrează cantități mari din acești hormoni, metabolismul bazal crește și totodată crește și consumul de oxigen. O serie de cercetători au constatat că tiroxina stimulează consumul de oxigen decuplând procesul de fosforilare oxidativă atunci când este adăugată la o suspensie de mitocondrii.

Dă asemenea există date care arată că tiroxina produce modificări în forma mitocondriilor - "swelling mitochondrial". Aceste modificări necesită cantități mari de hormoni.

Recent s-a observat că tiroxina induce o creștere a sintezei de flavoproteine mitocondriale și în special, o creștere a glicerol fosfat dehidrogenazei enzimă flavinică care participă în metabolismul glicerol fosfatului.

S-ar putea ca tiroxina să fie un inducător pentru sinteza enzimelor respiratorii din mitocondrii și în felul acesta să justifice **efectul stimulator al creșterii capacității stimulatorii**.



*Adrenalina.*



Adrenalina formată în celulele medulo-suprarenale transferată în ficat sau în celulele musculare cauzează o creștere a glicogenolizei stimulând activitatea fosforilazei. Activarea fosforilazei de către adrenalina nu se face direct, ci stimulând adenilciclaza care produce 3',5' - AMP ciclic din ATP. AMP ciclic activează fosforilaz-kinaza care transformă fosforilaza b în fosforilaza a activă.

Eliberarea glucozo-1-fosfat din glicogen, care rezultă ca urmare a efectului adrenalinei, crește pe de o parte respirația celulelor hepatice, iar pe de altă parte trecerea zahărului în circulația sanguină.

### Ciclul acizilor tricarboxilici.

Cea mai mare parte a energiei obținute de celulele cu metabolism aerob, provine din respirație, deci din transferul de electroni de la moleculele substrat la  $O_2$  molecular. Procesul de respirație celulară este un proces nou în scara evolutivă.

Cea mai mare parte a substratelor supuse oxidării în procesul de respirație celulară provine din ciclul acizilor tricarboxilici, denumit și "ciclul Krebs" etapă metabolică finală comună în care molecule din toate compartimentele metabolice (hidrați de carbon, acizi grași, amino acizi) sînt degradate final în procesul de catabolism.



În condiții optime de aerobioză, catabolismul glicolitic al glucozei nu mai merge până la lactat ci numai până la piruvat. Chiar și lactatul format anaerob în glicoliză, poate fi oxidat în condiții aerobe, în mod deosebit de puternic în ficat și în mușchiul cardiac, prin intermediul lactat dehidrogenazei din nou în piruvat, atunci când concentrația de piruvat și NADH este mică.

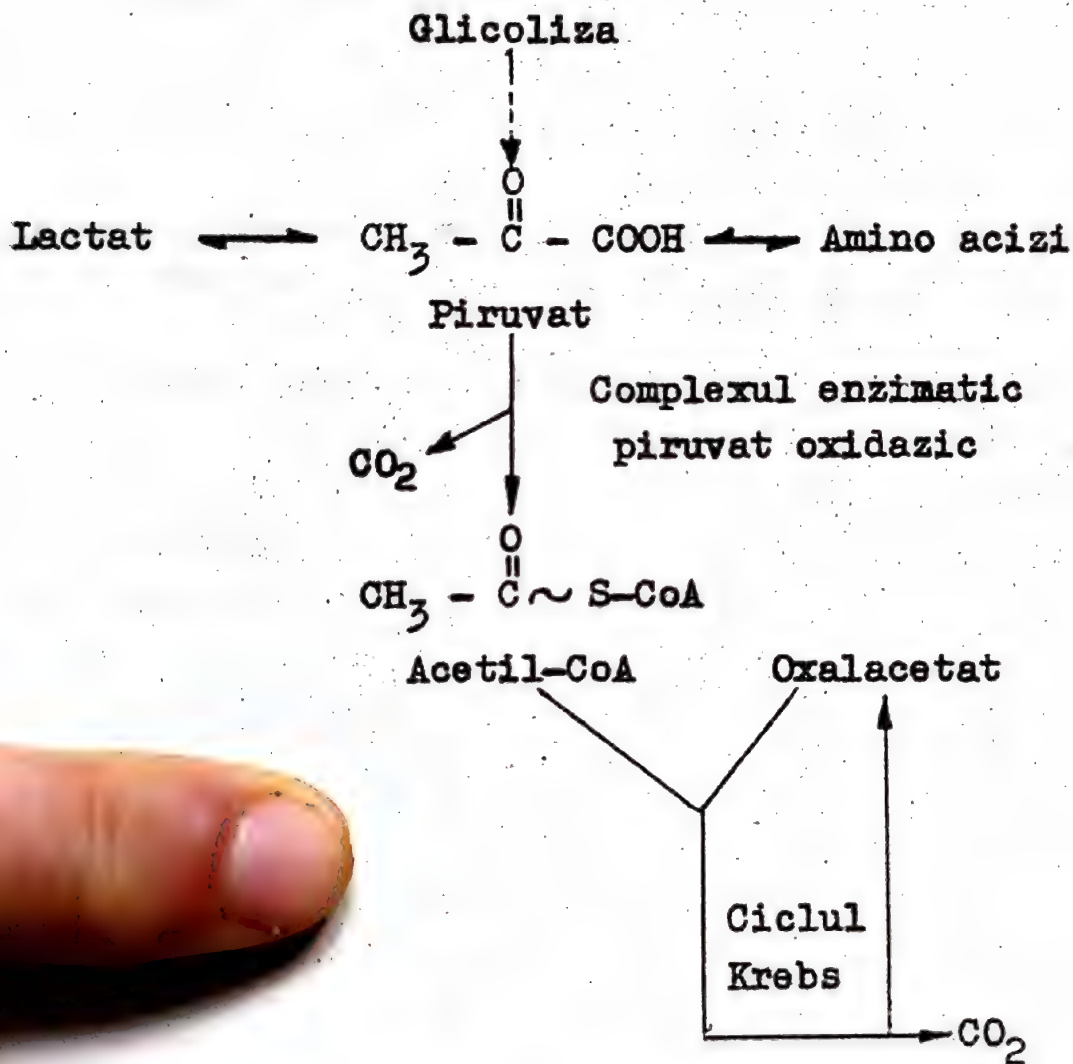
Piruvatul poate fi format de asemeni și din amino acizi și în special din alanină, serină, și cisteină.

Intr-un lanț metabolic de bază pentru metabolismul energetic prezent în toate celulele vii, piruvatul poate fi oxidat în trei molecule de  $\text{CO}_2$ . Degradarea piruvatului începe cu o decarboxilare oxidativă (reacția piruvat dehidrogenazei sau piruvat oxidazei) în care din piruvat se formează acetil CoA și  $\text{CO}_2$ . Apoi acetil CoA este oxidat în final în ciclul acidului citric sau ciclul Krebs sau ciclul acizilor tricarboxilici până la nivel de  $\text{CO}_2$ .

Ciclul Krebs este calea principală catabolică a piruvatului și deci și a acetil CoA în celula animală, vegetală și în celulele multor microorganisme



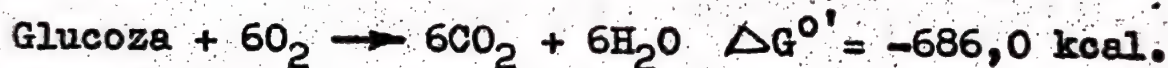
Schema degradării finale  
a piruvatului în Ciclul Krebs.



Din punct de vedere energetic respirația este un proces nou care apare la organismele superioare odată cu dezvoltarea aerobiozei pe planeta noastră.

Oxigenul a creiat respirația, înlocuind glicoliza comună organismelor inferioare, dar care persistă ca proces metabolic și la organismele superioare alături de respirația celulară.

Glicoliza este un proces metabolic în care este eliberată numai o parte din energia chimică presupusă prezentă în structura moleculei de glucoză. Mult mai multă energie se eliberează atunci când molecula de glucoză este oxidată complet pînă la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  așa cum se vede din compararea modificărilor de energie liberă standard obținută prin transformarea glucozei în lactat sau prin oxidarea glucozei în  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ .



De aici se vede că celulele care au o viață anaerobă trebuie să consume mult mai multă glucoză decît cele aerobe, pentru a obține aceeași cantitate de energie.

Bioxidul de carbon, produsul final de oxidare al glucozei, este o moleculă mult mai simplă și mult mai mică decît glucoza, iar atomul de carbon al acestuia este total oxidat.

În cazul respirației celulare oxigenul molecular fiind acceptor de electroni, se cîștigă mai multă energie decît în glicoliză unde acceptor de electroni este piruvatul.



Ciclul Krebs furnizează hidrogen pentru oxidarea biologică și în felul acesta este foarte strâns legat de metabolismul energetic celular.

Enzimele ciclului Krebs sînt situate în cea mai mare parte în mitocondrii.

### Dispoziția organizatorică intracelulară a respirației.

Degradarea enzimatică a substanțelor nutritive din celulă și anume, a hidraților de carbon, lipidelor și proteinelor, are loc printr-un număr de reacții enzimatice consecutive. Enzimele care catalizează aceste etape, și diferiții intermediari chimici formați în timpul degradării în etape a moleculelor nutritive sînt în cea mai mare parte cunoscute.

Catabolismul principalelor grupe de substanțe nutritive, așa cum arată Lehninger, are loc în trei etape majore și anume:

In etapa I moleculele de substanțe nutritive sînt degradate pînă la nivelul constituenților de bază. Astfel polizaharidele se degradează pînă la hexoze și pentoze, proteinele se degradează în amino acizi, iar lipidele în acizi grași, glicerol și celelalte componente.

In etapa II diferitele produse de degradare obținute în etapa I, sînt strînse la un loc și transformate într-un număr redus de molecule simple. În acest mod, hexozele, pentozele și glicerolul sînt degradate

pînă la nivel de glicerinaldehid 3-fosfat și apoi pînă la acetil CoA. În acetil CoA de asemenea sînt degradați și acizii grași și un număr important de amino acizi.

Amino acizii în acest stadiu de degradare, mai sînt transformați și în  $\alpha$ -cetoglutarat, succinat, oxal-acetat.

În etapa III în care are loc metabolismul final al scheletului carbonic al tuturor constituenților nutriționali prin oxidarea lor finală pînă la  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$  sînt introduși și produșii de degradare formați în etapa II.

Din figura din pagina următoare prezentată de Lehninger se văd cele trei etape ale catabolismului și anabolismului.

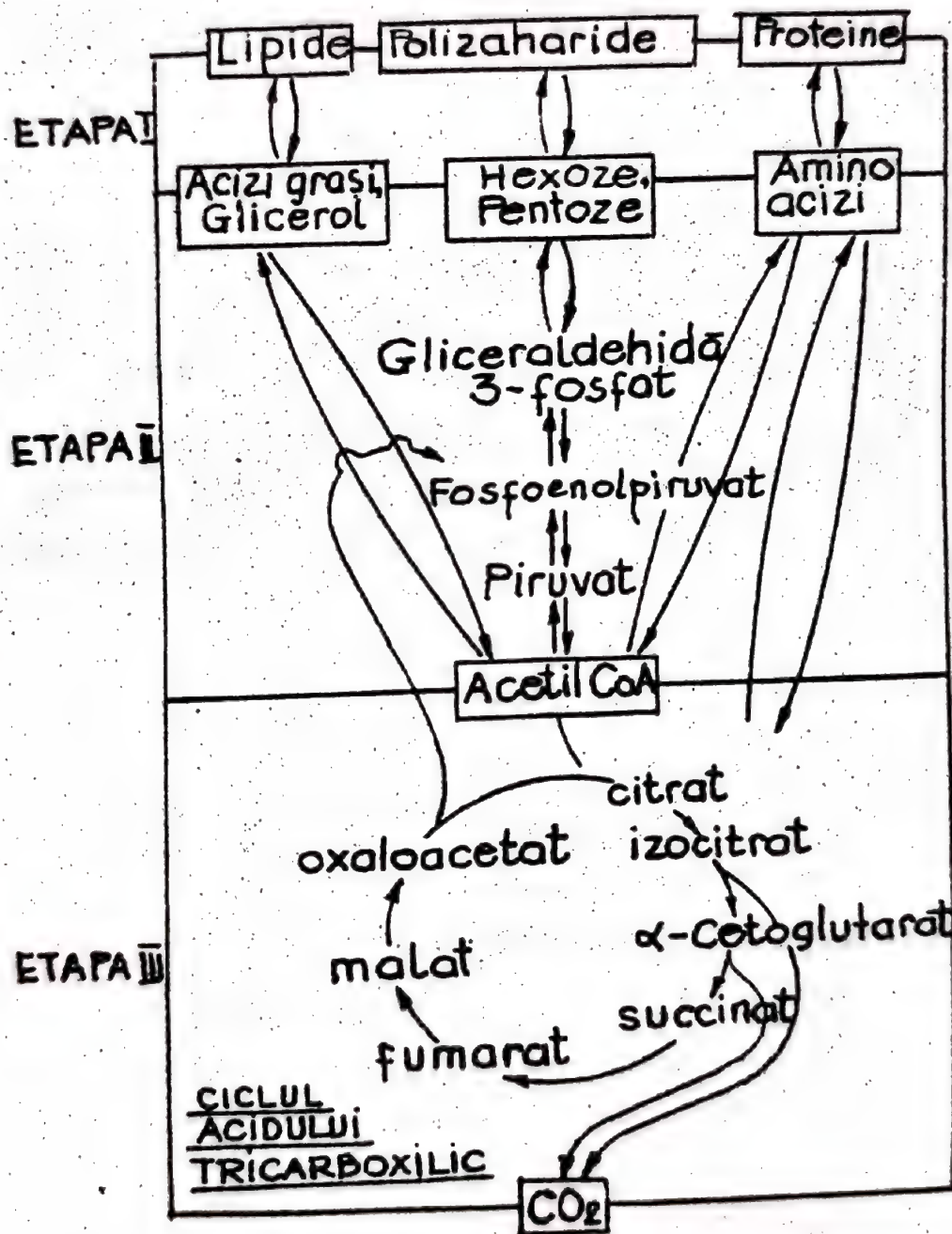
După cum se vede din această figură, anabolismul se desfășoară parcurgînd în sens invers aceleași trei etape pe care le-am arătat și în cazul catabolismului. Astfel, spre exemplu, se știe că sinteza amino acizilor pornește de la  $\text{CO}_2$  și  $\text{NH}_3$ .

Primele schelete carbonice ale amino acizilor, sînt ceto acizii corespunzători lor, care se sintetizează în etapa III.

În etapa II aceștia se aminează și se formează  $\alpha$  - amino acizii care în etapa I se polimerizează în peptide și proteine.

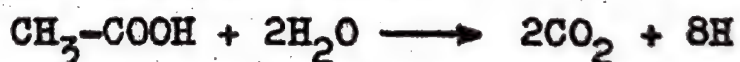
Din schema redată anterior, se vede că ciclul Krebs reprezintă etapa finală de metabolizare a scheletului carbonic al tuturor constituenților organici naturali din celulă.





Acetil CoA produs în etapa II a catabolismului este mai departe metabolizat în etapa III, deci în ciclul acizilor tricarboxilici, care reprezintă așa cum s-a mai arătat, etapa oxidativă comună catabolismului tuturor moleculelor combustibile din celulele aerobe. În acest ciclu restul de acetat este descompus cu formarea de  $\text{CO}_2$  și atomi de hidrogen. Atomii de hidrogen sau mai bine zis echivalenții electronici ai acestuia sînt apoi oxidați în catena respiratorie așa cum am văzut, după transportarea lor prin cîteva etape de către transportori specifici. Acest proces de transport de electroni spre oxigen, are loc cu o mare pierdere de energie liberă, din care cea mai mare parte se conservă sub formă de ATP în procesul de fosforilare oxidativă a ADP cu care este cuplat transportul de electroni.

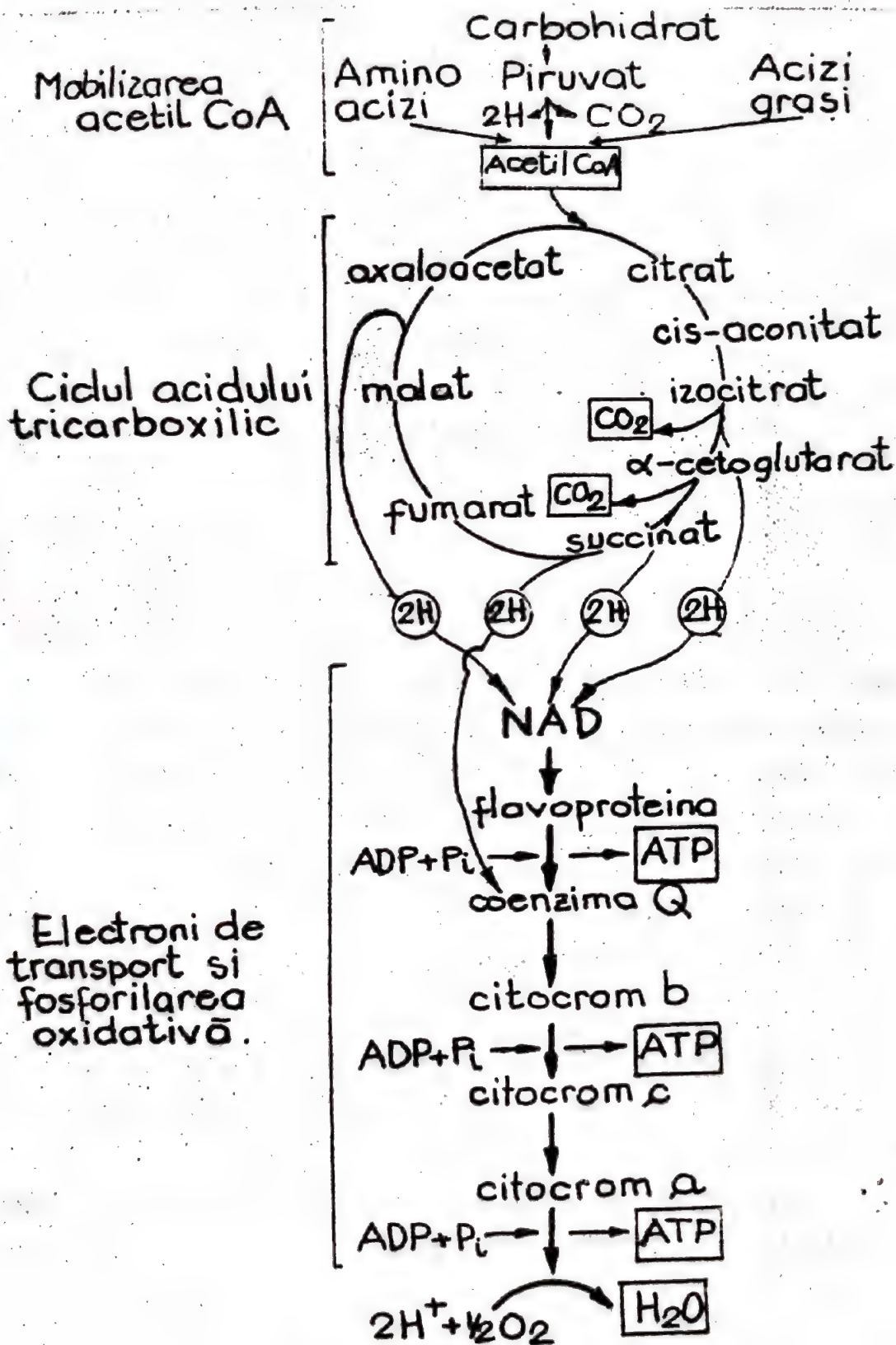
Reacția generală catalizată de ciclul Krebs poate fi redată în modul următor:



După cum se remarcă din această ecuație, în ciclul Krebs nu participă nici oxigenul molecular, nici fosforul anorganic și nici ATP.

Figura de pe pagina următoare exprimă sugestiv toate etapele fluxului respirator.





Din această figură se vede că ciclul Krebs este un fel de rafinărie în care se pregătește combustibilul rafinat sub formă de ioni de  $H^+$  pentru lanțul respirator care generează energie.

Funcția primară a ciclului acizilor tricarboxilici constă în dehidrogenarea acidului acetic pentru a forma în final două molecule de  $CO_2$  și patru perechi de atomi de hidrogen.

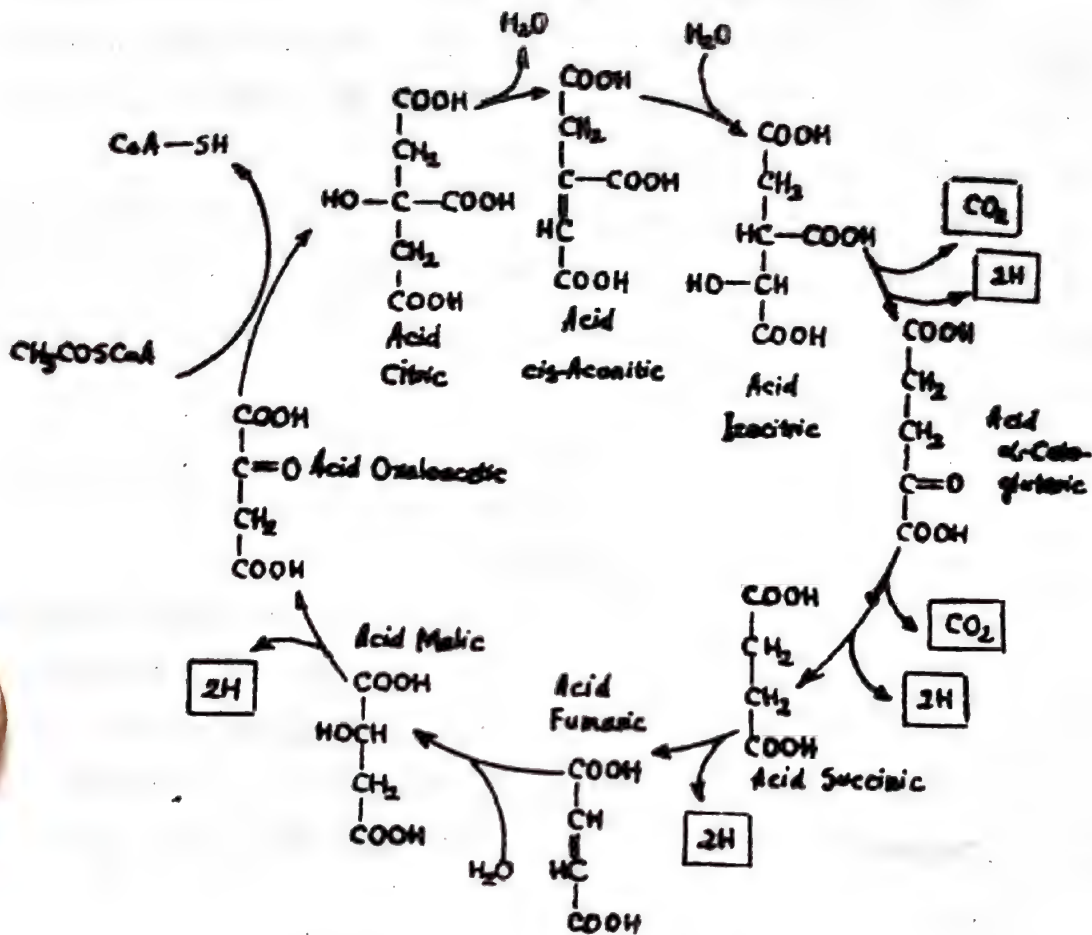
Acest proces este catalizat de un număr de reacții consecutive care este ciclic spre deosebire de secvența reacțională liniară a glicolizei.

La fiecare rotire a ciclului, o nouă moleculă de acid acetic (un fragment cu doi atomi de carbon), intră în ciclu și se condensează cu un fragment cu patru atomi de carbon care este acidul oxalacetic pentru a forma un fragment cu șase atomi de carbon care este acidul citric.

Deci, în sinteza acidului citric este vorba de o reacție de adiție a unui acid 2-C-monocarboxilic (restul de acetil) la un acid 4-C-dicarboxilic (oxalacetat) printr-o legătură carbon-carbon cu formarea unui acid tricarboxilic care este acidul citric.

Ulterior acidul citric este degradat cu formare de două molecule de  $CO_2$  iar în procesul de regenerare a oxalacetatului pentru o nouă condensare cu acetatul și deci pentru începerea unui nou ciclu, au loc patru dehidrogenări. De aici se poate deduce că oxalacetatul nu se consumă în timpul activității ciclului.





Se poate considera deci, că o moleculă de oxalacetat este suficientă pentru a oxida un număr infinit de molecule de acetat, deci o moleculă de oxalacetat catalizează oxidarea unui număr mare de molecule de acetat.

Pe de altă parte din această secvență reacțională, s-ar putea deduce și experimental că în respirația reticulocitară, oxalacetatul este un factor limitant atât în ciclul Krebs cât și în respirația celulară. (596)

Localizarea intracelulară a enzimelor  
ciclului Krebs.

Mitocondriile de ficat de șobolan suspendate într-un mediu tamponat ce conține fosfat, adenin nucleotide și  $Mg^{2+}$  catalizează oxidarea piruvatului și a intermediarilor ciclului acizilor tricarboxilici, cu ajutorul oxigenului molecular.

Capacitatea de oxidare a piruvatului pentru mitocondriile izolate din ficat, corespunde capacității respiratorii a ficatului intact.

Experimental s-a demonstrat că nucleii, microzomii și citoplasma celulară, sînt practic inactivi în procesul de respirație celulară.

Intrucît pentru respirație mitocondriile necesită adăugarea numai a adenin nucleotidelor și  $Mg^{2+}$  s-a dedus de aici că enzimele ciclului Krebs și ale lanțului transportor de electroni, sînt încorporate în structura mitocondriilor.

S-a demonstrat, că mitocondriile izolate din diferite țesuturi animale și vegetale, protozoare și alte microorganisme, pot efectua oxidările pentru toate substratele ciclului acizilor tricarboxilici.

O parte dintre enzimele acestui ciclu, au fost găsite și în citoplasma extramitocondrială, în special, malat dehidrogenaza, aconitaza, și fumaraza. Aceste enzime extramitocondriale au funcții în alte căi metabolice.



Reacțiile enzimatice ale ciclului acizilor tricarboxilici, au loc în compartimentul intern al mitocondriei. O serie de enzime ale ciclului Krebs, sînt puternic legate de membrana mitocondrială și de aceea greu de extras în formă solubilă. Izolarea, purificarea, și caracterizarea activității acestor enzime este mult mai dificilă decît pentru enzimele glicolitice care pot fi extrase cu ușurință în formă solubilă.

#### Secvența reactională în "Ciclul Krebs"

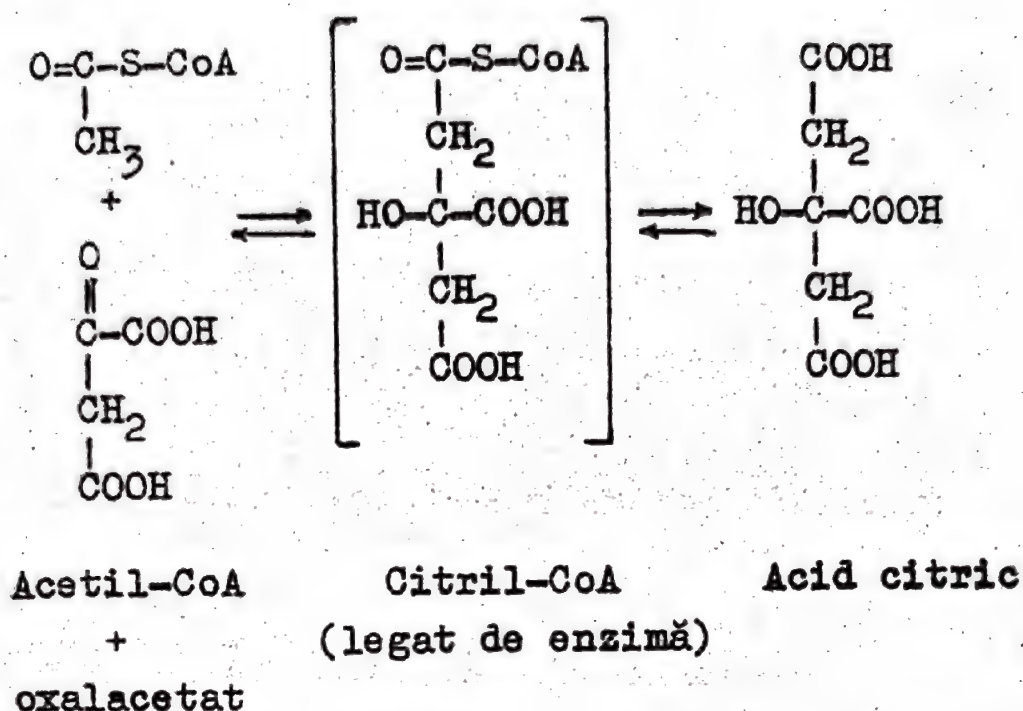
Pentru prima dată scheletul ciclului acizilor tricarboxilici a fost postulat de către Krebs în 1937. Pornindu-se de la acest schelet, s-au purificat enzimele și s-au stabilit reacțiile individuale, constituențe ale ciclului.

Așa cum am văzut din schemele prezentate mai sus, reacția de inițiere a ciclului acizilor tricarboxilici este reacția citrat sintetazei.

#### Citrat sintetaza.

Condensarea acetil CoA cu oxalacetatul pentru a forma citratul, este catalizată de citrat sintetaza, denumită și enzima de condensare.

Citrat sintetaza a fost obținută în stare cristalină<sup>(597)(598)</sup> In reacția catalizată de această enzimă restul de metil a acetil CoA se condensează cu atomul de carbon carbonilic al oxalacetatului după ecuația, reprezentată pe pagina care urmează.



Se vede că în reacție condensarea acetil CoA cu oxalacetatul duce la formarea într-o primă fază de citril CoA. Apoi, legătura tioesterică se rupe cu eliberarea de acid citric și coenzima A. Reacția se dezvoltă în direcția formării de citrat din cauza hidrolizei exergonice a legăturii macroergice tioesterice ( $\Delta G^{\circ} = -7,7\text{kcal.}$ ) Citrat sintetaza catalizează și formarea monofluorocitratului din monofluoracetil CoA și oxalacetat. Monofluorocitratul este un inhibitor puternic al aconitazei enzima următoare din ciclul acizilor tricarboxilici.

Citrat sintetaza este o enzimă limitantă în ciclul Krebs. Este puternic inhibată de ATP în multe organisme și de NADH în E.coli. (599)

Reglarea activității citrat sintetazei la ni-



vel celular sau subcelular are o importanță deosebită din punct de vedere fiziologic.

Determinînd etapa inițială a ciclului acidului citric pentru oxidarea acetil CoA provenită din piruvat sau acizi grași, reglarea acestei enzime poate determina soarta metabolică a acetil CoA, capacitatea funcțională a ciclului Krebs și deci și furnizarea de echivalenți reduși pentru lanțul respirator și sinteza de ATP.

De asemeni reglarea activității acestei enzime, controlează nivelul celular al citratului, intermediar metabolic implicat în controlul activității pentru cel puțin două enzime citoplasmatică și anume, pentru activitatea acetil CoA carboxilazei, enzimă ce inițiază procesul de biosinteză al acizilor grași și care este activată de citrat,<sup>(600)</sup> și pentru activitatea fosfofructokinazei, enzimă limitantă din glicoliză, care este puternic inhibată de citrat.<sup>(601,602)</sup>

Citratul este de asemeni descris ca sursă de resturi de acetil și echivalenți reducători pentru sinteza de acizi grași în citoplasmă.<sup>(603,604)</sup>

Există date care arată că enzima este reglată cu o serie de inhibitori alosterici. Dintre compuși descriși ca inhibitori ai enzimei, cităm adenin nucleotide ca: ATP, ADP, și AMP<sup>(597,598,605)</sup> și NADH<sup>(599,606)</sup> dintre piridin nucleotidele reduse.

Enzima mai este inhibată de acizi grași cu catenă carbonică lungă<sup>(607)</sup> și de către  $\alpha$ -cetoglutarat.<sup>(608)</sup>

Atkinson și Goodwin<sup>(609)</sup> enunță așa numita "ipoteză a controlului cu adenilați" a citrat sintetazei, demonstrând inhibiția acestei enzime cu concentrații fiziologice de ATP, ADP și AMP. Acești autori demonstrează dependența metabolismului carbonului din mitocondrii și celulă de raportul  $(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$ . Această reglare cu adenin nucleotide a ciclului Krebs, se poate datora influenței ATP, ADP și AMP asupra:

- fosfofructokinazei,
- citrat sintetazei și
- izocitrat dehidrogenazei NAD specifice

Cînd în celulă concentrația de ATP este mare iar concentrația de ADP și AMP este mică, metabolismul carbonului este redus datorită inhibiției cu ATP a celor trei enzime arătate mai sus.

Dacă ATP este în concentrație mică iar ADP și AMP sînt în concentrație mare, nivelul de activitate al celor trei enzime crește puternic.

Reglarea citrat sintetazei cu adenin nucleotide se complică mult după ce o serie de autori observă că inhibiția enzimei cu ATP este reversibilă la adăugarea de  $Mg^{2+}$  (605, 610, 611)

Se presupune că cea mai mare parte a ATP, din țesuturi se găsește sub formă de  $(ATP-Mg)^{-2}$ -chelate. O concentrație de ATP de 4  $\mu$ mol/g greutate umedă și o concentrație de  $Mg^{2+}$  de 10  $\mu$ mol/g greutate umedă ca aceea găsită în ficat, este practic suficientă pentru a face ca ATP liber să poată inhiba citrat sintetaza.



Inhibiția citrat sintetazei cu acizi grași-CoA cu catenă carbonică lungă, ca de ex. palmitil-CoA, este nespecifică și poate fi evitată prin creșterea concentrației de proteine din mediu. (612,613)

Așa cum s-a mai arătat oxalacetatul este limitant în formarea de citrat. (584,585,586,614) Așa cum s-a demonstrat  $K_m$  pentru oxalacetat al citrat sintetazei este de 2 - 5  $\mu M$ , iar concentrația intracelulară de oxalacetat în ficatul intact (615) este de numai 0,1-0,4  $\mu M$ , deci mult mai mică decât  $K_m$  enzimei pentru substrat. În aceste situații, modificări mici în concentrația de oxalacetat pot influența mult sinteza de citrat.

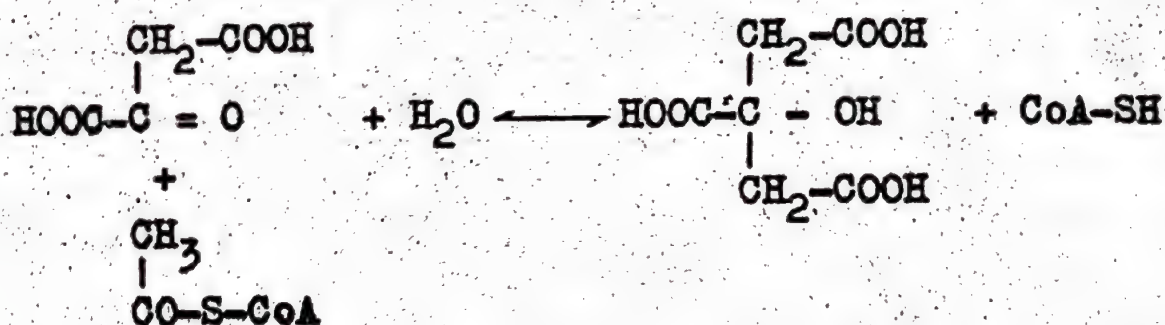
Garland (616,617,618) a studiat sinteza de citrat și controlul acesteia cu adenin nucleotide și observă că în mitocondriile decuplate cu puțin ATP, sintetizează primar citrat, în schimb mitocondriile cuplate cu mult ATP sintetizează primar acetoacetat și foarte puțin citrat. Se pare că cel mai important element în sinteza de citrat rămâne aportul de oxalacetat și acetil CoA, iar efectul adenin nucleotidelor și al NADH trebuie văzut la acest nivel și nu direct la nivelul citrat sintetazei ca atare.

Sinteza de acetil CoA din piruvat ca sursă principală, s-a descris la Capitolul Vitamina B<sub>1</sub> și la Acidul Pantotenic din prima parte a cursului nostru. (619,620)

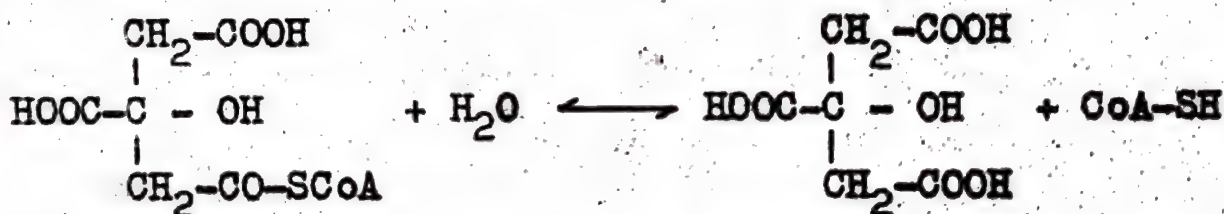
Studiind activitatea citrat sintetazei (621) din inimă de porc, s-a constatat că această enzimă catalizează trei tipuri de reacții și anume:

- activitate liazică
- activitate hidrolazică
- activitate enolazică.

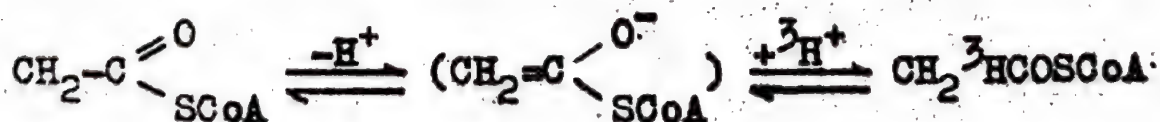
Activitatea liazică este redată de ecuația:



Activitatea hidrolazică este redată de ecuația care arată hidroliza S-citril-CoA :



Iar activitatea enolazică este redată de ecuația de încorporare a tritiului deci apă cu tritium, în acetil CoA. Această reacție necesită malat ca inductor



Citrat sintetaza și malat sintetaza catalizează același tip de condensare a unui oxoacid cu acetil



CoA și are loc în același tip de reacție stereochemică. Diferența constă pe de o parte în necesarul de cofactori și anume, malat sintetaza necesită pe lângă acetyl CoA și glioxilat și ioni de  $Mg^{2+}$  pe când citrat sintetaza, enzimă ce catalizează cele trei reacții arătate mai sus nu necesită ioni acetilici.

Wright<sup>(673)</sup> purificând citrat sintetaza din *E.coli* ajunge la concluzia că proteina activă catalitic este un tetramer cu o greutate moleculară de 248.000 în care fiecare monomer are o greutate moleculară de 62.000. La pH 8,0 - 9,5 citrat sintetaza în concentrații mari sau diluată, se prezintă într-o mixtură în echilibru în care pe lângă tetrameri activi catalitic, găsim octameri și structuri monomerice.

La pH 7,0 echilibrul se deplasează înspre formare de octameri iar ditiotreitolul condiționează formarea numai a acestei specii de octameri.

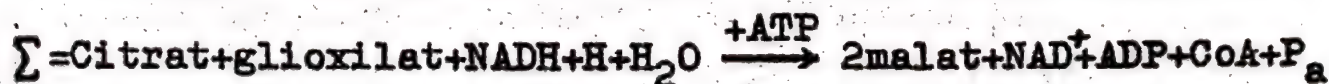
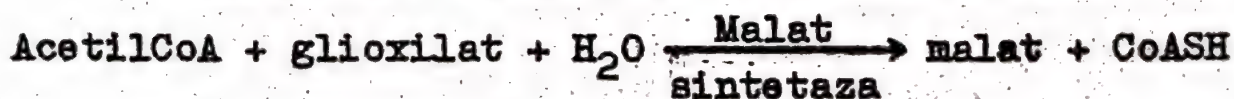
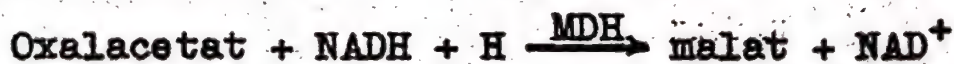
La pH 11,0 enzima disociază ireversibil cu formarea de monomeri. Enzima nativă are 1,5 - 2 grupări sulfhidrice/monomer iar enzima denaturată cu dodecilsulfat are opt grupe SH/monomer. Reactivitatea grupărilor SH libere nu se schimbă în prezența substratului acetyl-CoA sau a inhibitorilor alosterici -  $\alpha$ -cetoglutarat și NADH.

Datele cu privire la legarea substratelor inhibitorilor sînt în general în conformitate cu comportarea modelelor alosterice,<sup>(674,675)</sup> care postulează interacțiuni cooperative datorită legării diferențiate

a liganzilor la două sau mai multe stări conformaționale ale moleculei.

Mariyama<sup>(676)</sup> purificând citrat sintetaza din inimă și ficat de șobolan, găsește unități identice cu greutate moleculară de  $1 \times 10^5$  compuse fiecare din câte două subunități de asemeni identice. Proprietățile cinetice sînt similare și gradul de inhibiție cu ATP este de asemeni similar. Turnoverul enzimei (capacitatea) este de  $1,3 \times 10^4$  moli substrat convertit/minut/moleculă de enzimă la  $28^\circ\text{C}$ . Enzima este mai concentrată în inimă decît în ficat raportată la greutatea organelor respective.

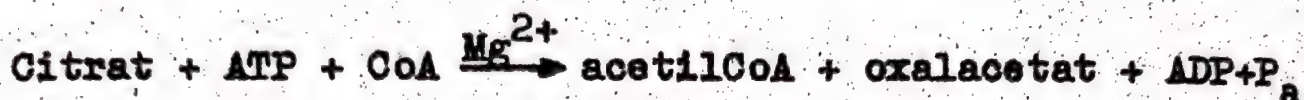
Lenz și Buckel<sup>(622,623,624)</sup> arată că o ATP-citrat liază produce acetyl CoA și nu acetat din citrat. S-a obținut malat din citrat după incubarea unei mixturi în care s-a combinat scindarea citratului cu NADH și malat dehidrogenaza, ca și cu glioxilat și malat sintetază după ecuațiile:



O citrat liază sau cum se mai numește "enzimă de scindare a citratului" a fost obținută și purificată



din ficat de porc, (625) inimă de bovine, (626) inimă de porc, (627) din unele bacterii, (628) din ficat de găină, (629) și din alte surse. Această enzimă catalizează reacția :



Studiindu-se reacțiile (671, 672) parțiale ale enzimei, s-a ajuns la concluzia că scindarea citratului are loc după un mecanism ping-pong conținând următoarele etape:



Este de reținut și faptul că în prima etapă intervin și ioni de  $\text{Mg}^{2+}$ . Enzima poate fi purificată și separată fără a fi contaminată cu enzima de condensare (sinteză) a citratului.

Citrat liaza participă în reglarea capacității de sinteză a acizilor grași din ficat, dar nu cu rol principal. (630)

Srere (629) arată că citrat liaza este localizată în citoplasma celulară, acolo unde se sintetizează

zează cea mai mare parte a acizilor grași cu catenă carbonică lungă.

S-a demonstrat faptul că citratul este precursor în sinteza de acizi grași<sup>(631,632)</sup> și că în unele condiții, perturbările din sinteza acizilor grași sînt paralele cu perturbările din activitatea citrat liazei.

Se știe că citratul este un modulator negativ al fosfofructokinazei. Citratul produs în ciclul acizilor tricarboxilici în mitocondrii, poate părăsi mitocondria cu ajutorul unui sistem de transportor specifici pentru citrat, care se găsește în membrana mitocondrială și care reprezintă mobilul pentru transportul citratului în citoplasmă.

În condițiile de supraproducere de citrat, acesta acționează ca un inhibitor puternic pentru fosfofructokinază și deci pentru glicoliză, reducînd în acest mod și producerea de acetyl CoA.

Așa cum am mai văzut, citratul în citoplasmă este supus și activității citrat liazei care-l scindează în prezența ATP și CoA în acetyl CoA și oxalacetat, cu eliberare de ADP și P-anorganic.

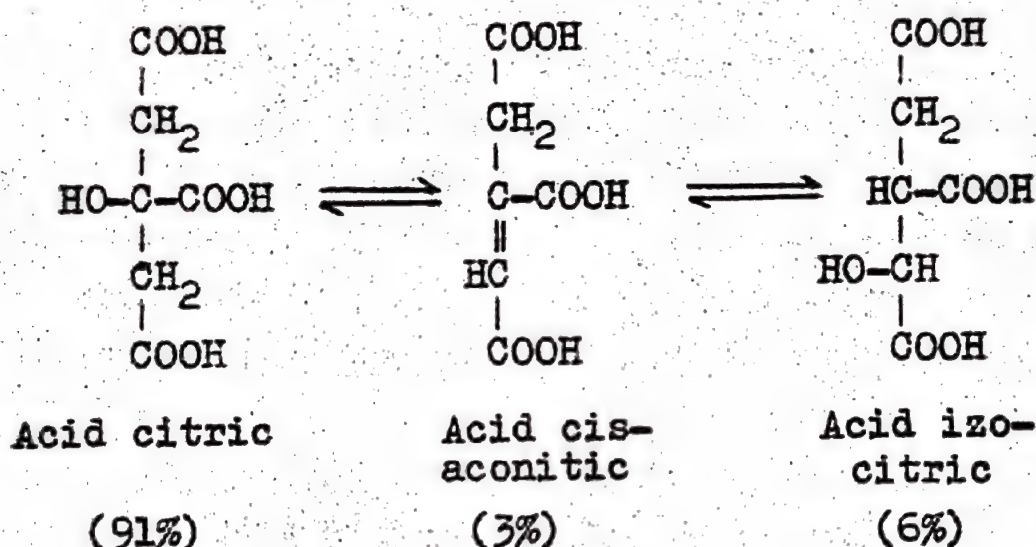
Aconitaza (aconitat hidratata sau citrat - izocitrat hidroliza).

Aconitaza catalizează transformarea acidului citric în acid cis-aconitic, iar apoi acesta în acid izocitric. La pH 7,4 și la 25°C mixtura în echilibru conține circa 91 % citrat, 3 % cis-aconitat și 6 %



izocitrat. Reacția implică aditia reversibilă de apă la legătura dublă  $\alpha, \beta$  a cis-aconitatului. Enzima este stabilizată și activată de FeII și cisteină.

Stereochimia și mecanismul de acțiune a aconitazei a servit ca obiect pentru multe studii. Reacția aconitazei are loc după următoarea ecuație:



Aconitaza este o enzimă care a fost găsită atât în mitocondrii cât și în citoplasma diferitelor țesuturi de la diferite specii animale. (631,632,633,634)

În celulele ficatului de șobolan numai 22 % din totalul activității de aconitat hidratază este asociată cu mitocondria, în timp ce restul activității este găsită în citoplasmă.

Aconitat hidrataza din mitocondrii și din citoplasmă au comportament diferit în timpul cromatografiei pe DEAE-celuloză, enzima mitocondrială fiind eluată mult mai rapid decât cea citoplasmatică. S-au cons-

tatat diferențe între enzima citoplasmatică și mitocondrială în ceea ce privește determinarea punctului izoelectric.<sup>(635)</sup> Pentru citrat și izocitrat  $K_m$  în producerea de izocitrat pare să fie asemănător pentru cele două forme ale enzimei. Activarea enzimei cu citrat și izocitrat pare să fie în aceleași limite pentru ambele forme.

Aceste date arată că enzima mitocondrială și citoplasmatică par să fie similare în comportamentul cinetic.

Aconitaza a fost găsită într-o serie de plante superioare. În timpul purificării se pierde activitatea enzimei care poate fi restaurată la adăugare de ioni feroși împreună cu cisteină, tioglicolat, ascorbat și glutatation. Se pare că intracelular enzima este asociată cu un compus cu Fe care în procesul de purificare se separă și produce pierderea activității enzimei.<sup>(636)</sup>

Aconitaza, așa cum arată Villafranca<sup>(670)</sup> pe baza studiilor de rezonanță electronică paramagnetică de spin un atom Fe(III) care are un rol structural și necesită doi atomi Fe(II)/moleculă pentru activitatea catalitică. Fe(III) din enzima purificată nu este prezent în structura porfirinică și nici în structură asemănătoare cu cea a feredoxinei sau rubredoxinei, ci într-o structură asemănătoare cu cea a conalbuminei sau transferinei.

Activarea aconitazei cu Fe(II) și cisteină, arată prezența a două locuri de legătură cinetic bine distincte pentru 89.000 greutate moleculară.



Nu se știe dacă aceste locuri sînt structural similare. Tot cu rezonanță paramagnetică de spin s-au detectat două locuri de legătură pentru  $Mn^{2+}$  pe molecula de aconitază, care însă nu au importanță pentru activitatea catalitică și care nu sînt competitive cu  $Fe(II)$ .

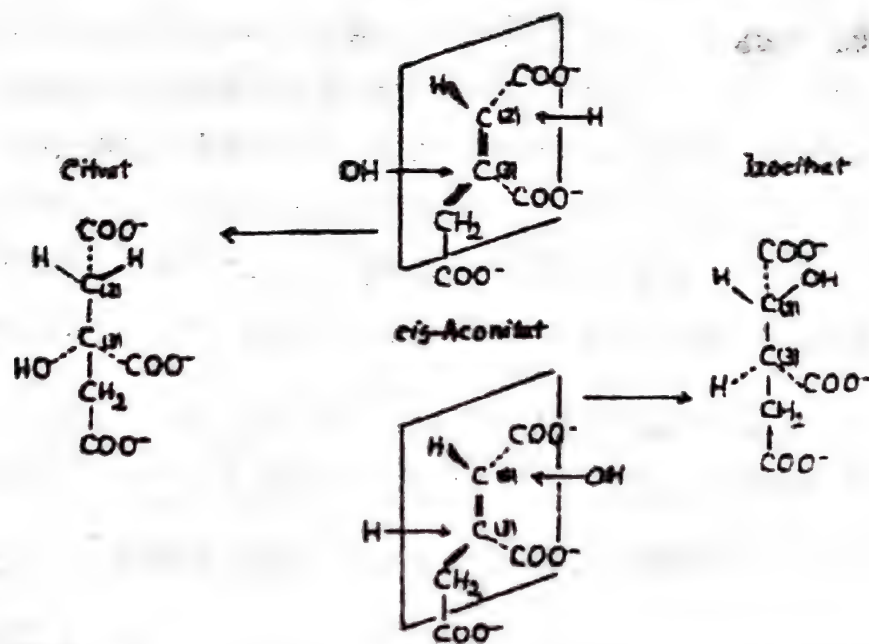
Așa cum s-a arătat mai sus, fluorocitratul este un inhibitor puternic al aconitazei. De asemeni oxalmalonatul este un puternic inhibitor al aconitat hidratazei și al izocitrat dehidrogenazei. Oxalmalonatul este cunoscut și ca inhibitor al respirației celulare.<sup>(637,638)</sup>

Intrucît atît oxalmalonatul cît și hidroxicetoglutaratul (alt inhibitor al aconitazei) se formează în condiții fiziologice de temperatură și pH prin condensarea glioxilatului ( $CHO-COOH$ ) fie cu oxalacetat fie cu piruvat, formarea acestor inhibitori joacă un rol probabil important în reglarea ciclului acizilor tricarboxilici.

Aconitat hidrataza este o enzimă care așa cum am văzut poate cataliza în acelaș timp, adiționarea de apă în două direcții, una ducînd la formarea de acid citric, iar cealaltă la formarea de acid izocitric.

Din cauză că acidul izocitric are o conformație stereo-chimică specifică în jurul atomilor săi de carbon asimetrici, și din cauză că acidul aconitic are o dublă legătură în cis, există restricții sterice pe care elementele apei trebuie să le respecte atunci cînd se fixează la dubla legătură.

Lehninger<sup>(639)</sup> dă următoarea schemă de hidratare a cis-aconitatului în cele două direcții :



Din experiențe cu substrat marcate cu deuteriu, se poate deduce că H și OH aditionează la dubla legătură a cis-aconitatului, trans unul față de celălalt.

Activitatea aconitazei așa cum s-a mai arătat este stabilizată de ionul de Fe, care în același timp formează un chelat complex cu acidul citric.

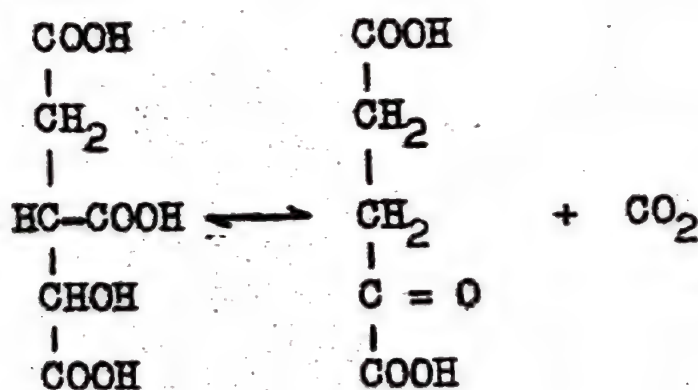
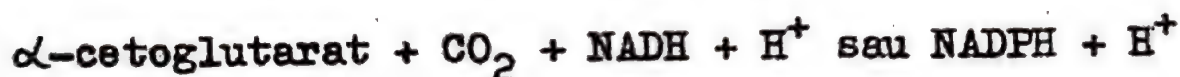
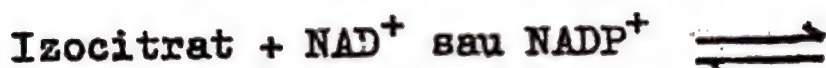


### Izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă.

Izocitrat dehidrogenaza este o enzimă aloste-  
rică care reprezintă un punct important de control pen-  
tru activitatea ciclului acizilor tricarboxilici.

Pentru mulți ani s-a considerat că izocitrat dehidrogenaza es-  
te o enzimă NADP-dependentă. În ultima perioadă, s-a  
stabilit că izocitrat dehidrogenaza - enzimă care cata-  
lizează oxidarea izocitratului în  $\alpha$ -cetoglutarat -  
necesită în calitate de acceptor de electroni NAD sau  
NADP.

Reacția generală catalizată de aceste două ti-  
puri de izocitrat dehidrogenaze este identică :



Acid izocitric

Acid  $\alpha$ -ceto-  
glutaric

În mitocondrii pot fi găsite atât izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă cât și izocitrat dehidrogenază NADP-dependentă.<sup>(646)</sup>

O izocitrat dehidrogenază NADP-dependentă a fost găsită și în citoplasmă. În ciclul acizilor tricarboxilici așa cum s-a stabilit recent, poate fi găsită numai izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă. Enzima NADP-dependentă este implicată în special în reacțiile biosintetice.

Enzima din ciclul Krebs (dependentă de NAD) necesită prezența ADP în calitate de activator alosteric specific. În absența acestuia enzima este inactivă. Pentru activitate, enzima mai necesită prezența ionilor de  $Mg^{2+}$  sau de  $Mn^{2+}$ .

Legarea ADP de locul alosteric are un efect stimulator maximal la concentrații mici de izocitrat, fapt ce poate fi interpretat în sensul că ADP scade  $K_m$  a enzimei pentru izocitrat și deci condiționează creșterea afinității enzimei pentru substratul ei.

NADH inhibă puternic activitatea enzimei în competiție cu NAD; un inhibitor puternic pentru activitatea enzimatică este și ATP.

Rolul fiziologic al izocitrat dehidrogenazei NAD-dependente ca enzimă operativă în ciclul Krebs, a fost stabilit pe baza distribuției intracelulare a enzimei de către Goebell și Klingenberg.<sup>(640,641)</sup> La aceleași concluzii ajunge și Nicholls și Garland<sup>(642)</sup>.



Purificând izocitrat dehidrogenaza din drojdie s-a observat că enzima este activată de către AMP care îi crește afinitatea pentru NAD și izocitrat.<sup>(643,644)</sup>

Studiind oxidarea piruvatului în mitocondriile mușchilor aripilor la insecte, Hansford<sup>(645)</sup> demonstrează că această oxidare este dependentă de ADP și că enzima limitantă în această oxidare este izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă. Este posibil ca în oxidarea piruvatului, rol limitant să aibă și etapa de oxidare a 2-oxoglutaratului, care de asemeni face să fie dependentă de concentrații mari de ADP și de  $P_a$ .

Izocitrat dehidrogenaza NAD-dependentă din inimă de bovine poate fi găsită într-o formă monomerică cu o greutate moleculară de 330.000 și într-o formă dimerică. ADP pe lângă efectul alosteric mai prezintă și efectul de stimulator al dimerizării moleculei de izocitrat dehidrogenază. În această acțiune un efect contrar îl are NADH. Atât forma monomerică cât și forma dimerică a enzimei sînt active. Forma dimeră pare mai activă însă, la concentrații mici de ADP.

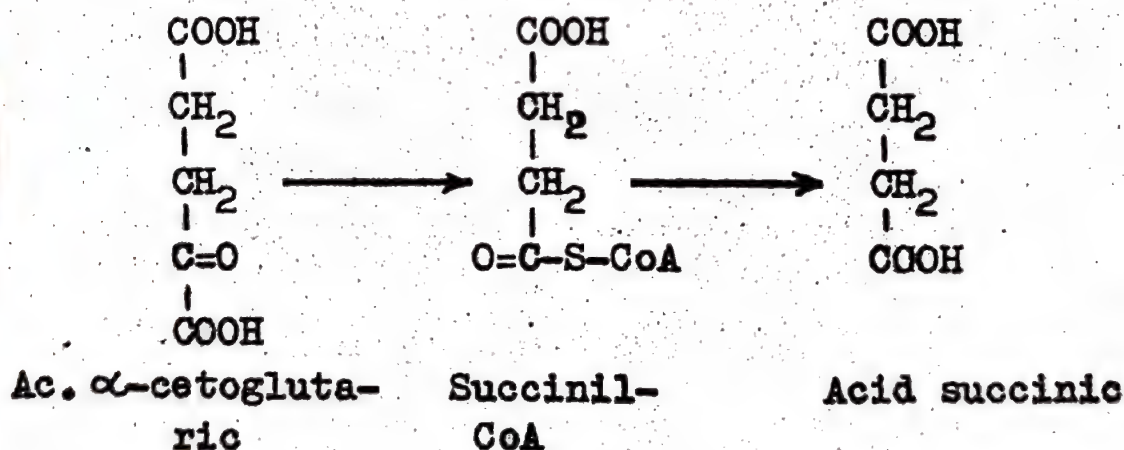
Dacă citrat sintetaza este primul punct de control al ciclului acizilor tricarboxilici, izocitrat dehidrogenaza reprezintă cel de al doilea punct de control al acestui ciclu.

În mușchii aripilor de la insecte izocitrat dehidrogenaza pare să fie factorul principal limitant al ciclului Krebs.

### $\alpha$ -Cetoglutarat oxidaza

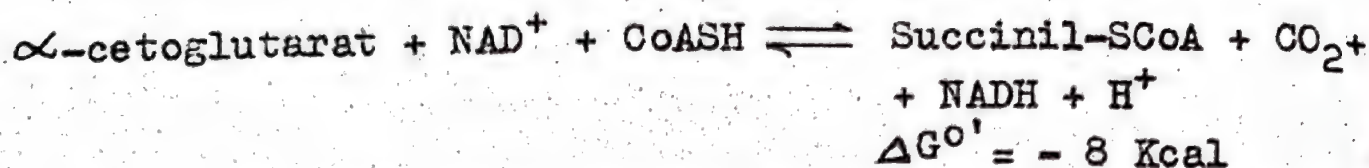
Oxidarea acidului  $\alpha$ -cetoglutamic la succinat care la heterotrofe este ireversibilă, are loc în două etape. Într-o primă etapă,  $\alpha$ -cetoglutaratul este supus decarboxilării oxidative cu formare de succinil-S-CoA și  $\text{CO}_2$ .

Într-o a doua etapă, succinil-S-CoA care este un tioester macroergic al unei grupări carboxilice a acidului succinic, este scindată în acid succinic și CoASH nu prin hidroliză simplă, ci printr-o reacție care conservă energie cu guanozin difosfat și Pa.



Formarea succinil-S-CoA în prima etapă are loc în prezența unui complex multienzimatic  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenazic care este similar ca structură și proprietăți, complexului piruvat dehidrogenazic.<sup>(619,620)</sup> Reacția catalizată de acest complex are loc după ecuația:

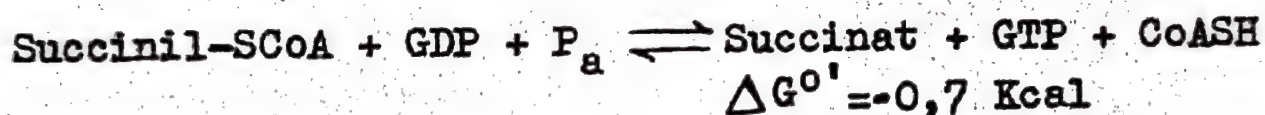




După cum se știe, acest proces de decarboxilare oxidativă mai necesită participarea tiamin pirofosfatului (TPP) și acidului lipoic.

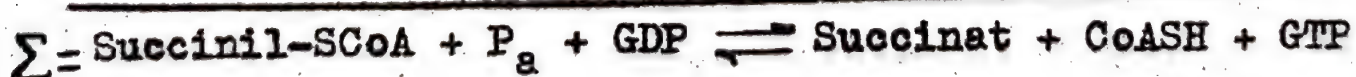
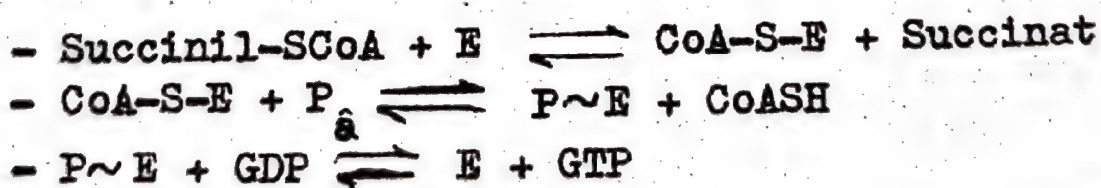
Complexul  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenazic izolat din țesuturi animale și din E.coli, are o greutate moleculară de  $2,1 \times 10^6$ .

Etapa a doua este catalizată de succinil tiokinază sau succinil CoA sintetază:



Formarea GTP se face pe seama legăturii tioesterice macroergice a succinil CoA. În celulele animale enzima este specifică pentru GDP și  $\text{P}_a$  ca acceptor.

Reacția succinil tiokinazei are loc în următoarele etape:



S-a demonstrat experimental că în această secvență reacțională se formează un complex de enzimă fosforilată, la incubarea cu  $^{32}\text{P}$ , succinil-SCoA și  $\text{Mg}^{2+}$ , în absența GDP sau se formează un complex de enzimă

fosforilată la incubare cu GTP cu  $^{32}\text{P}$  în prezența  $\text{Mg}^{2+}$ . Restul 3-fosfohistidină este donatorul de fosfat în formarea GTP.

În reacția nucleozid difosfokinazei GTP format în această reacție donează gruparea fosfat terminală ADP -ului pentru a forma ATP după ecuația :

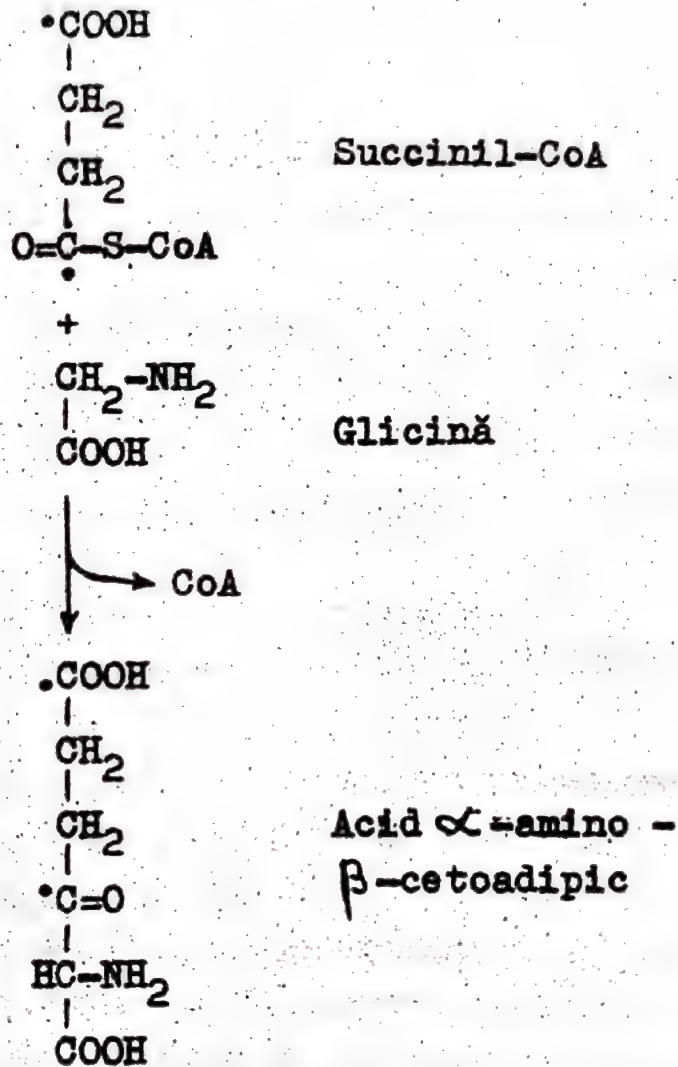


Formarea GTP sau ATP în timpul oxidării  $\alpha$ -cetoglutaratului nu este inhibată de 2,4 - dinitrofenol.

Formarea de ATP cuplată cu deacilarea succinil CoA poartă denumirea de fosforilare la nivelul substratului, pentru a o deosebi de fosforilarea cuplată cu lanțul respirator. Succinil CoA poate fi deacilată și în reacția de condensare cu glicina din ciclul Shemin din sinteza porfirinelor, în care prin condensarea succinil CoA cu glicina se obține acidul  $\alpha$ -amino-  $\beta$  -cetoadipic.

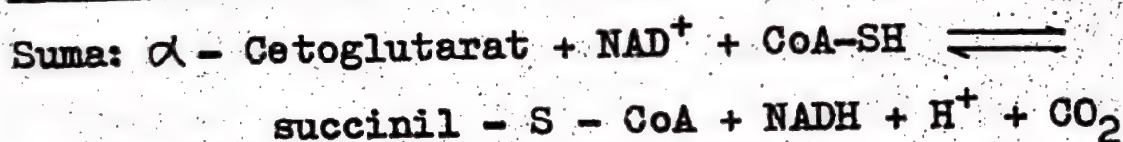
Pe pagina următoare este redată schema biosintezei acestui acid:





Descriind mecanismul de oxidare a  $\alpha$ -cetoglu-  
taratului în E.coli, Hager și Kornberg<sup>(647)</sup> arată că  
acesta poate fi despărțit pentru prima etapă a acestei  
oxidări care se termină cu formarea de succinil - S-CoA  
în patru stadii :

1.  $\alpha$ -Cetoglutarat + TPP  $\rightleftharpoons$   
[succinic semialdehidă] - TPP + CO<sub>2</sub>
2. [Succinic semialdehidă] - TPP + lip-S<sub>ox</sub>  $\rightleftharpoons$   
succinil - S - lip. + TPP
3. Succinil-S-lip. + CoASH  $\rightleftharpoons$   
succinil - S CoA + lip - S<sub>red</sub>
4. Lip - S<sub>red</sub> + NAD<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  lip - S<sub>ox</sub> + NADH + H<sup>+</sup>



Massey<sup>(648,649)</sup> a stabilit că  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenaza conține și o componentă flavoproteică cel puțin în țesuturile animale.

Studiindu-se activitatea complexului  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenazei din *Acinetobacter* sp. s-a constatat că AMP și ADP stimulează activitatea enzimei prin scăderea K<sub>m</sub> pentru cetoglutarat. ATP și NADH inhibă activitatea complexului. <sup>(650,651)</sup>

Studiul reglării cu adenilați ai complexului, arată că efectorii acționează alosteric. Tratatamentul cu uree 1 M desensibilizează complexul la AMP și ADP fără



pierderea activității. Această desensibilizare, este însoțită de scăderea  $K_m$  pentru  $\alpha$ -cetoglutarat. Efectele adenilaților și a NADH asupra complexului  $\alpha$ -cetoglutarat dehidrogenază este în concordanță cu un rol reglator în carbonul ciclului acizilor tricarboxilici. După cum se presupune, acest control operează la nivelul primei componente enzimatică și inhibiția cu NADH reprezintă un mecanism feedback în interiorul complexului propriu zis.

Membrana mitocondrială internă, conține un set de translocatori care catalizează reacțiile de schimb dintre anionii localizați în citoplasmă și cei localizați în spațiul matriceal al mitocondriei.

Reacții de schimb au fost demonstrate pentru adenin nucleotide și pentru marea majoritate a ciclului acizilor tricarboxilici. (652,653,654,655,656)

Translocarea are loc stoechiometric compus pentru compus. Mecanismul este însă necunoscut. Aceste translocări pot controla viteza secvențelor metabolice catalizate de enzime localizate în diferite compartimente celulare. Un translocator pentru  $\alpha$ -oxoglutarat a fost pus în evidență în mitocondriile de ficat de șobolan și este de fapt un translocator pentru dicarboxilați care catalizează reacțiile de schimb dintre diferiți dicarboxilați ca, 2-oxoglutarat, malat, malonat și succinat. Acest translocator nu catalizează schimbul dintre acești anioni și ioni de fosfat. (656,657,658,660)

Afinitatea translocatorului pentru oxogluta-

rat este mai mare pentru substratele externe decât pentru substratele corespunzătoare interne. Constanta Michaelis crește în următoarea ordine: oxoglutarat extern < malat extern < malonat extern < oxoglutarat intern < malat intern < malonat intern.

Afinitatea translocatorului pentru un substrat este independentă de natura ionului de schimb. Transportorul de oxoglutarat are o singură legătură pentru oxoglutarat și pentru ceilalți dicarboxilați. Tricarboxilații în concentrații mari blochează transportorul, legându-se de locul de adiție al substratului fără a fi transportați.<sup>(659)</sup> Se presupune că substratul se leagă prin grupările carboxilice de transportor prin intermediul unui ion metalic. Nu este însă exclusă și formarea de punți de hidrogen între substrat și transportor.

#### Succinat dehidrogenaza.

Oxidarea acidului succinic în fumarat, se face cu ajutorul unei flavoproteine numită, succinat dehidrogenaza, care conține flavin adenin dinucleotid legat covalent în calitate de acceptor de hidrogen.



Enzima redusă poate dona electroni la numeroși acceptori de electroni artificiali, ca de ex. la coloranți reducători; acceptorul normal de electron pentru succinat dehidrogenaza fiind încă insuficient cunoscut.



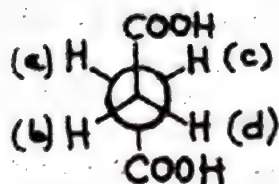
Succinat dehidrogenaza este puternic legată de membrana mitocondrială. Cu toate că a fost extrasă de pe membrană și înalt purificată, este foarte probabil că are o organizare complexă a subunităților.

Enzima izolată din inimă de bovine, are o greutate moleculară de circa 175.000 și conține o moleculă de FAD legată covalent și care poate fi eliberată prin digestia triptică a enzimei.

Enzima conține de asemeni patru atomi de Fe, patru atomi de S într-o formă chimică necunoscută, și care prin acidifiere duc la formarea de  $H_2S$ .

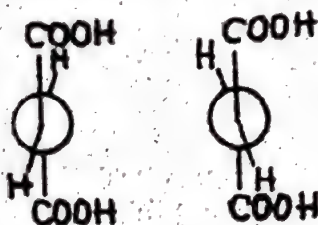
Este posibil ca în timpul activității succinat dehidrogenazei, atomii de Fe să sufere modificări de valență Fe(II) - Fe(III). Fierul din succinat dehidrogenază este Fe neheminic. Fierul neheminic și atomii de sulf labili, sînt prezenți în subunități distincte de succinat dehidrogenază, denumite proteine cu fier neheminic.

Stereochimia eliberării ionilor de hidrogen de pe succinat cu ajutorul succinat dehidrogenazei, a fost studiată și cu ajutorul deuteriului ( $^2_1H$ ) ca atom marcat, s-a putut stabili că dehidrogenaza rupe de pe succinat atomii de hidrogen din poziția trans a carbonului metilenic a succinatului, după reacția redată pe pagina următoare :

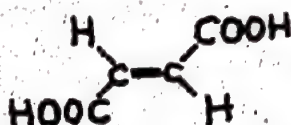


Acidul succinic

Trans-dehidrogenaza



Acidul fumaric



Succinat dehidrogenaza îndepărtează perechea trans a atomilor de H, a + d și b + c pentru a forma acidul fumaric un compus trans. Enzima nu îndepărtează perechea cis a + b sau c + d. În acidul fumaric grupele carboxil și atomii de H care rămân sînt în plan perpendicular pe pagină.

Pe baza unei colaborări inițiate între laboratoarele din Konstanța, San Francisco, și Stockholm în 1965, se încep studii de stabilirea structurii succinat dehidrogenazei. Astfel s-a stabilit că lanțul peptidic este legat la ciclul benzenic al riboflavinei în poziția 8- $\alpha$ -metilenică. (662,663)

S-a mai demonstrat că structura polipeptidică se leagă de structura flavinică printr-un rest de histidină și anume, cu un azot din ciclul imidazolic. (664)



Ulterior s-a sintetizat histidil-8- $\alpha$ -riboflavina<sup>(665)</sup> și s-a elucidat structura secvențională la nivelul centrului activ.<sup>(666,667)</sup>

S-a izolat un flavinpentapeptid de pe membrana internă mitocondrială de inimă, și din succinat dehidrogenaza purificată și solubilă.<sup>(668)</sup> Studiind aceste structuri, s-a ajuns la concluzia că gruparea prostetică FAD a succinat dehidrogenazei mitocondriale, este legată covalent prin poziția 8- $\alpha$  de proteină.

Prin hidroliză acidă<sup>(669)</sup> s-a putut stabili că există în succinat dehidrogenază un raport histidină/FAD egal cu 1/1.

Succinat dehidrogenaza are unele din proprietățile unei enzime alosterice și anume, este activată de fosfat, succinat, și fumarat, și este complet inhibată de concentrații extrem de mici de oxalacetat. Deci, acumularea de oxalacetat, ultimul acid dicarboxilic din ciclul Krebs, poate să inhibe propria-i formare din succinat. Oxalacetatul este un inhibitor mai puternic al succinat dehidrogenazei decât malonatul.

Urmărind activitatea succinat dehidrogenazei în procesul de evoluție, s-a observat că în trecerea de la anaerobioză la anaerobioza facultativă, se dezvoltă tendința enzimei de a cataliza reducerea fumaratului mai rapid decât oxidarea acestuia.<sup>(677,678)</sup>

Organismele anaerobe facultative conțin o singură succinat dehidrogenază, proprietățile căruia sînt adaptate egal la metabolismul aerob și la cel anaerob, sau conțin

două enzime ca în E.coli în care o enzimă predomină în creșterea aerobă a celulei, asemănătoare cu enzima mamiferelor, iar cealaltă predomină în creșterea anaerobă a celulelor și este adaptată la funcția reductivă.<sup>(679)</sup>

S-a văzut deci, că la aceste microorganisme cu viață anaerobă facultativă, există două enzime care catalizează fie oxidarea succinatului, fie reducerea fumaratului. Ambele enzime sînt particulate - legate de structură - iar separarea lor s-a obținut prin obținerea unei mutante ( $S^-$ ) care pierde o enzimă și menține capacitatea de sinteză pentru cea de a doua.

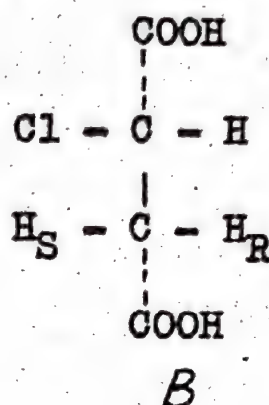
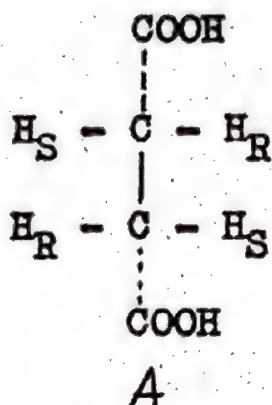
În succinat dehidrogenaza, FAD este legat covalent iar gruparea prostetică constituie un bloc constitutiv al enzimei; în schimb în fumarat reductază flavina nu este legată covalent.

Recent<sup>(680)</sup> studiindu-se schimbul de hidrogen între (S)-clorosuccinat și apă în prezența succinat dehidrogenazei cu ajutorul spectrometriei de masă, rezonanței magnetice nucleare și a dispersiei optice rotatorii, s-a ajuns la concluzia că succinat dehidrogenaza, catalizează un schimb de doi atomi de hidrogen și anume:  $H_{metinic}$  și  $H_R$  al grupării metilenice. Procesul de schimb a celor doi atomi de hidrogen are loc simultan.

Incubînd succinat nemarcat în  $^2H_2O$  s-a observat că  $H_R$  - atomii sînt schimbați de trei ori mai rapid decît  $H_S$ -contrapartenerii.

Dăm mai jos formulele structurale ale acidului succinic (A) și a acidului (S)-clorosuccinic (B).





După această incubare s-a observat că se acumulează acid/succinic(S)-clorosuccinatul reprezintă un substrat pentru succinat dehidrogenaza atât în procesul de oxidare cât și în reacția de schimb anaerob. Incubând acest compus cu succinat dehidrogenază s-a observat că schimbul afectează în special atomi  $\text{H}_R$  ai grupării metilenice.

Studiindu-se transportul succinatului în veziculele membranare de la *E.coli*, *Bacillus subtilis*, și *Pseudomonas*, s-a observat că acesta are loc printr-un sistem de transport activ legat de lanțul transportor de electroni.

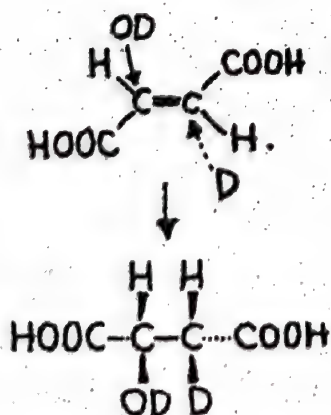
Inhibitorii lanțului respirator inhibă și transportul succinatului. Activitatea succinat dehidrogenazei legată de membrana bacteriană nu este legată și de transportul succinatului. Transportul succinatului este puternic inhibat de către alți acizi tricarboxilici din aceste trei microorganisme, sugerînd faptul că aceștia folosesc același transportor. Transportul de succinat este represat de glucoză.

### Fumaraza.

Hidratarea reversibilă a fumaratului la L-malat este catalizată de fumarază, o enzimă obținută în stare cristalină din inimă de porc. Reacția are loc după următoarea ecuație:



Fumaraza activează stereospecific întrucât ea formează numai stereoisomerul L-malat. Studiile stereo- chimice ale mecanismului enzimei folosind apă marcată cu deuterium au arătat că fumaraza catalizează trans- adiția de H și OH la dubla legătură a fumaratului. Deși fumaratul este o moleculă simetrică, gruparea OH poate fi adiționată numai de o singură parte a dublei legă- turi formînd stereoisomerul L-malat.



eritre-3 monodeutero-  
L acid malic



Greutatea moleculară a enzimei este în jur de 200000; este un tetramer care la desfacere în forme monomere devine inactiv. ATP scade afinitatea fumarazei pentru fumarat.

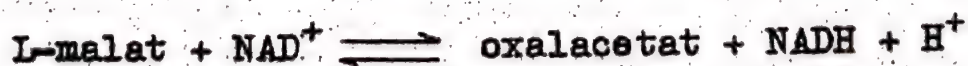
Studiind activitatea fumarazei din mușchiul de inimă de porc, Albright<sup>(681)</sup> observă că enzima catalizează și hidratarea L-izomerului de trans 2,3-eposuccinat pentru a forma mezotartrat. Si această reacție este stereospecifică.

Fumaratul acționează ca inhibitor al reacției de hidratare a L-trans-2,3-eposuccinatului de către fumarază și invers L-trans-2,3-eposuccinatul inhibă activitatea fumarazei de transformare a fumaratului în malat.

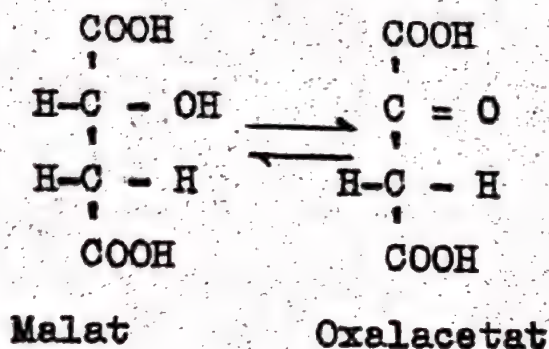
Mezotartratul este un inhibitor puternic a transformării fumaratului în malat.<sup>(682)</sup>

#### Malat dehidrogenaza.

Ultima reacție în ciclul Krebs este malat dehidrogenaza care catalizează oxidarea malatului în oxalacetat după ecuația:



$$\Delta G^{\circ'} = - 7,1 \text{ Kcal.}$$



NADP participă numai într-o mică măsură ca acceptor de hidrogen în reacție.

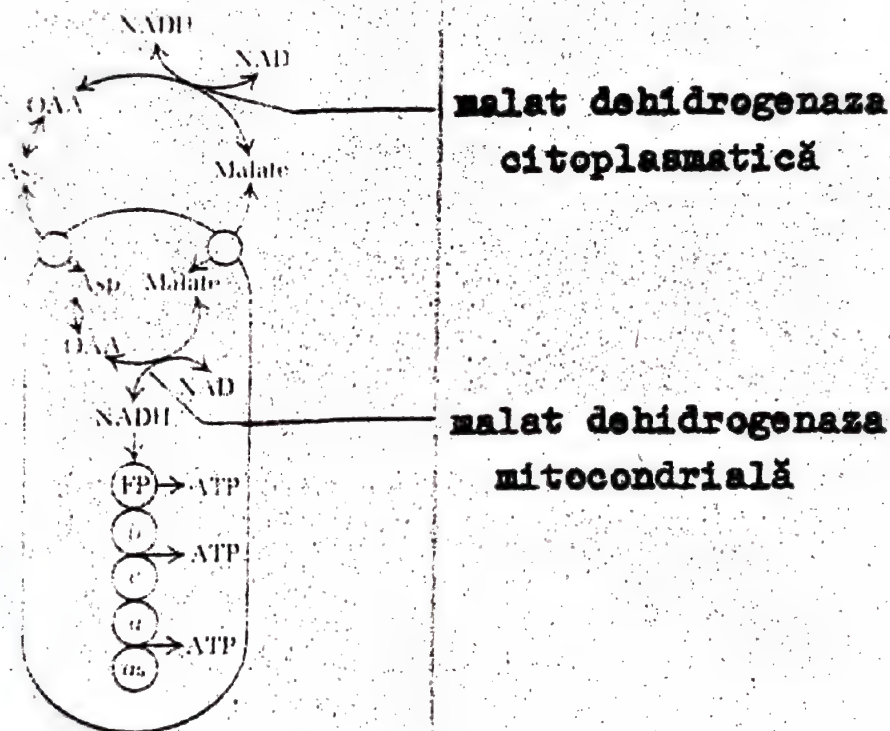
Există două tipuri de malat dehidrogenaze, o malat dehidrogenază mitocondrială și una citoplasmatică. Studiind comparativ cele două malat dehidrogenaze, Holbrook<sup>(683)</sup> arată că ambele enzime leagă o moleculă de NADH pentru fiecare subunitate. Cu creșterea pH-ului, legarea NADH de enzimă se face mai greu. În funcție de pH există diferențe în constanta de disociere a NADH și hidroximalonatului.

Malat dehidrogenaza din citoplasmă este o enzimă alosterică și leagă două molecule de NADH per  $8 \times 10^4$  g enzimă (greutatea moleculară a formei dimer a enzimei).<sup>(684, 685)</sup>

Lehninger descrie un așa numit ciclu al malatului în ficat în care NADH extramitocondrial este oxidat de către oxalacetat sub acțiunea malat dehidrogenazei citoplasmatică pentru a forma malat care intră în mitocondrie mobilizat de un sistem de transportori specifici pentru malat-succinat. Malatul este apoi oxidat la oxalacetat sub acțiunea unei malat dehidrogenaze intramitocondriale.



După cum se vede în figura de mai jos,<sup>(686)</sup> ciclul malatului este reversibil și funcționează în ambele direcții:



Ferguson<sup>(687)</sup> descrie o inactivare a malat dehidrogenazei din celulele de drojdie cu ajutorul glucozei. Inhibiția cu glucoză a activității malat dehidrogenazei este pusă pe seama unui efect de "inactivare-represie" care descrie un tip de represie catabolică în care activitatea enzimatică scade după adăuga-

rea represorului.

Malat dehidrogenaza localizată în mitocondria de inimă reprezintă o proteină omogenă la analiza ultracentrifugală și imunochimică.<sup>(688)</sup> Cu toată omogenitatea au fost descrise câteva forme enzimatic active ale enzimei mitocondriale.<sup>(689)(690,691,692,693)</sup>

În forma nativă aceste forme de malat dehidrogenază arată mobilitate electroforetică deosebită, în schimb, proprietăți cinetice și stabilitate termică identică.

Malat dehidrogenaza din mitocondriile și citoplasma de ficat de șobolan se deosebesc după viteza de reacție în dependență de concentrația oxalacetatului.

În foame activitatea malat dehidrogenazei din citoplasmă scade, în timp ce activitatea enzimei din mitocondrii crește. Această creștere este oprită de actinomycină.

Se consideră că reglarea malat dehidrogenazei din mitocondrii este efectuată în sensul unei represii cu hidrați de carbon sau cu metaboliți proveniți din metabolismul hidraților de carbon.<sup>(694,695,696,697)</sup>

O serie de lucrări arată că malat dehidrogenaza mitocondrială participă în gluconeogeneza hepatică.

Este posibil ca numai o fracțiune a activității malat dehidrogenazei crescută în foame, să fie necesară pentru gluconeogenază, în timp ce malat dehidrogenaza mitocondrială prezentă în stare normală de nutriție să funcționeze în catabolismul hidraților de carbon în ciclul acizilor tricarboxilici.<sup>(694)</sup>



Malat dehidrogenaza conține în structura sa 14 pînă la 16 resturi de cisteină mascate și care nu reacționează cu para-cloromercuribenzoatul (PCMB) sau alte săruri de mercur. (698,699)

În structura malat dehidrogenazei din inimă de porc s-a demonstrat prezența unui rest de histidină, esențial pentru activitatea enzimatică. (699,700) Iod acetamida inhibă enzima iar NADH protejează activitatea enzimei. Efect protector asupra activității enzimei o are și o mixtură de oxalacetat și NAD sau ADP-riboză dar nu oxalacetatul și malatul. Aceasta demonstrează formarea unui complex ternar activ.

Pentru transportul malatului prin membrana mitocondrială în activitatea ciclului malatului descris de Lehninger, au fost identificați în aceste membrane transportori specifici pentru malat. (653)

### Procesul de fosforilare oxidativă nucleară.

Konings<sup>(701)</sup> arată că dacă procesul de fosforilare oxidativă din nucleii celulelor hepatice este controversat, în nucleii izolați din timus acesta este o realitate.

Faptul că respirația acestor nucleii și sinteza de ATP nu este afectată de iodacetat ( $5 \times 10^{-2} M$ ) arată că hidrații de carbon nu reprezintă substrate pentru respirația nucleară. (702)

Se știe că iodacetatul este inhibitor specific

al glicerin 3-fosfat dehidrogenaza.

Pentru respirația nucleară, principală sursă de respirație o reprezintă acizii grași endogeni. Oxidarea nucleară a lipidelor este afectată de oligomicynă, 2,4-dinitrofenol (DNP) și antimycin A în aceeași măsură în care se inhibă și respirația nucleară. (701,703)

S-a arătat că fosforilarea oxidativă nucleară in vitro nu poate fi stimulată de substrat adăugate exogen, și că este total dependentă de surse endogene. (701, 704,705,706) Nucleii de timus conțin toți citocromii implicați în lanțul respirator și anume citocromul a, a<sub>3</sub>, b, c, și c<sub>1</sub>.

Berezney (707) arată că în nucleii celulelor animale sînt prezente toate enzimele oxidative și propune schema unui sistem de transport de electroni pentru nucleii celulari.

Enzime oxidative au fost izolate din nucleii de ficat de șobolan, (708) de șoarece, (709) de bovine, (710,711)

Enzimele respiratorii sînt puternic concentrate în fracțiunile de membrană nucleară. (712)

Consumul de O<sub>2</sub> nuclear diferă de cel mitocondrial printr-o rezistență mare la inhibiția cu histone și o rezistență față de inhibiția cu ADN-ază. Preparatele nucleare sînt lipsite de coenzima Q.

Raportul NADH/citocrom c oxidaza este 1,3 în nucleu și 0,5 în mitocondrii.

Rolul fiziologic al respirației nucleare pentru activitatea celulară rămîne încă neclar.



Bibliografie

1. LEHNINGER A.L. - Biochemistry, Worth Publishers Inc. 1972 N.Y. p.3
2. BÜCHER TH., KLINGENBERG M. - Angew.Chem. 70,552,(1958)
3. PALADE G. - J.Cell.Biol. 1,188,(1953)
4. WHITTAKER V.P. in "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" (J.M.Tager, S.Popa E.Quagliariello, E.C.Slater, eds.) Vol.7 Elsevier (B.B.A.Library, Amsterdam p.1 1966)
5. ANDREJ - J.Ultrastruct.Res.Suppl. 3 (1962)
6. BROSEMER R.W., VOGELL W., BÜCHER TH. - Biochem.Z. 338, 854,(1963)
7. NASS M.M.K. - Science 165,26,(1969).
8. KROON A.M. - Handbook of Molecular Cytology (Ed.A Lima-De-Faria North Holland, Amsterdam, London p.875,1969).
9. SWIFT H., WOSTENHOLME D.R. - Handbook of Molecular Cytology (Ed.A. Lima De-Faria North Holland, Amsterdam, London p.972,1969)
10. LUCK D.J.L., REICH E. - Proc,Natl.Acad.Sci.U.S. 52, 931,(1964).
11. RABINOWITZ M., SWIFT H. - Physiol.Rev. 50,376,(1970)
12. KROON A.M., SACCONI C., BOTTMAN M.J. - Biochim.Biophys Acta 142,552,(1967).

13. WINTERSBERGER E. - Z.Physiol.Chem. 336,285,(1964)
14. KALF G.F. - Biochemistry 3,1702 (1964)
15. KUROIWA P. - Exp.Cell.Res. 78,351,(1973).
16. OJALA D.,ATTARDI G. - J.Mol.Biol. 65,273,(1972).
17. O'BRIEN T.W.,KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2172,  
(1967).
18. O'BRIEN T.W.,KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2180,(  
(1967).
19. RANK G.H. - Canad.J.Genet.Cytol. 12,129,(1970).
20. PARSONS J.A. - J.Cell.Biol. 25,641,(1965).
21. STONE G.F.,MILLER O.L. - J.Expt.Zool. 159,33,(1965)
22. GUTTES E.W.,HANAWALT P.C.,GUTTES S. - Biochim.Bio-  
phys.Acta 142,181,(1967).
23. PARSONS J.A.,RUSTAD R.C. - J.Cell.Biol. 37,683,  
(1968).
24. REICH E.,LUCK D.J.L. - Proc.Nat.Acad.Sci.Wash. 55,  
1600,(1966).
25. WINTERSBERGER E. - Biochem.Biophys.Res.Comm. 25,1,  
(1966).
26. PARSONS P.,SIMPSON M.V. - Science 155,91,(1967).
27. MATTOCCIA-PICA L.,ATTARDI G. - J.Mol.Biol. 64,465,  
(1972).
28. LINNANE A.W., in "Biochemical Aspects of the Bio-  
genesis of Mitochondria" ed.by  
Slater E.C.,Tager J.M.,Papa S.,Qua-  
gliarIELLO E.,Bari-Adriatica Editri-  
ce p.333 (1968).





29. LINNANE A.W., HASLAM J.M. in "Current Topics in Cellular Regulation ed. by Horecker B.L., Stadtman E.R. Vol. II p.101, Acad. Press. N.Y., 1970,
30. THOMAS D.Y., WILKIE D. - Genet. Res. Camb. 11, 33, (1968)
31. COEN D., DEUTSCH J., NETTER P., SLONIMSKI P.P. in "Control of Organelle Development Ed. by Miller P.L. Cambridge Univ. Press. p.449 (1970).
32. GINGOLD E.B., SAUNDERS G.W., LUKINS H.B., LINNANE A.W. - Genetics 62, 735, (1969).
33. SAUNDERS G.W., GINGOLD E.B. in "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplast" Ed. by Boardman M.K., Linnane A.W., North Holland Publ. Com. p.185 (1971).
34. RANK G.H. - Canad. J. Genet. Cytol. 12, 129, (1970).
35. ANTILIO L.A., APPEL S.H., PETTIS P., GAMBETTI P.L. - Biochemistry 7, 2615, (1968).
36. MORGAN I.G., AUSTIN L. - J. Neurochem. 15, 41, (1968).
37. HERNANDEZ A., BURDETT I., WORK T.S. - Biochem. J. 124, 327, (1961).
38. GORDON M.W., DEANIN G.G. - J. Biol. Chem. 243, 4222, (1968).
39. CUNINGHAM R.D., BRIDGERS W.F. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 99, (1970).
40. GRAY E.G., GUILLERY R.W. - Int. Rev. Cytol. 18, 111, (1966).

41. WHITTAKER V.B. - Progr.Biophys.Molec.Biol. 15,39, (1965).
42. BLOND D.M., WHITTAM R. - Biochem.J. 92,158,(1964).
43. MORGAN I.G. - FEBS Lett. 10,273,(1970).
44. GAMBETTI P., GONATAS N.K. - J.Cell.Biol. 174,68 a, (1970).
45. O'BRIEN T.W., KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2172, (1967).
46. O'BRIEN T.W., KALF G.F. - J.Biol.Chem. 242,2180, (1967).
47. WATSON M.L., ALDRIDGE W.G. - J.Histochem.Cytochem. 12,96,(1964).
48. KISLEV N., SWIFT H., BOGORAD L. - J.Cell.Biol. 25, 327,(1965).
49. MUNRO H.N., FIECK A. - Analyst. 91,78,(1966).
50. LOWRY O.H., ROSENBROUGH M.J., FARR A.L., RANDALL R.J. - J.Biol.Chem. 193,265,(1951).
51. LOEWY A.G., SIEKEVITZ P. in "Cell Structure and Function" 2-nd.Edition, Holt Rinehart and Winston London N.Y. Sydney, Toronto, p.33,(1972).
52. PALADE G.E. - J.Histochem.Cytochem. p.188,(1953)..
53. GRANIK S. - in "The Cell" J.Brachet, Kirky A.E. Ed. Acad.Press. N.Y. p.242,(1961).
54. Granik S., GIBOR A. - Science 145,820,(1964)..
55. NOVIKOFF A.B. in "The Cell" Vol.2,p.299, Acad.Press. (1961).
56. FRY M., WEISSBACH A. - Biochemistry 12,3602,(1973).



57. NASS M.W.K. - Proc.Nat.Acad.Sci,U.S, 56,1215,(1966)
58. CORNEO G.,ZARDI L.,POLLI E. - J.Mol.Biol. 36,719,  
(1968).
59. CLAYTON D.A.,VINOGRAD J. - Nature 216,652,(1967).
60. CLAYTON D.A.,VINOGRAD J. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.  
62,1077,(1969).
61. NASS S. - Biochim.Biophys.Acta. 145,60,(1967).
62. PARSONS J.A.,ARISTAD R. - J.Cell.Biol..37,683,(1968)
63. GROSS N.J.,RABINOWITZ M. - J.Biol.Chem. 244,1863,  
(1969).
64. PARSONS P.,SIMPSON M.V. - Science 155,91,(1967).
65. BREWER E.N.,DEVRIES A.,RUSCH H.P. - Biochim.Bio-  
phys.Acta 145,686,(1967).
66. KAROL M.H.,SIMPSON M.V. - Science 162,770,(1968).
67. KALF G.F.,CHIH J.J. - J.Biol.Chem..273,7907,(1968).
68. MEYER R.R.,SIMPSON M.V. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.  
61,130,(1968).
69. MEYER R.R.,SIMPSON M.V. - J.Biol.Chem. 245,3426,  
(1970).
70. WU G.J.,DAWID I.B. - Biochemistry 11,3589,(1972).
71. REID B.D.,PARSONS P. - Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 68,  
2830,(1971).
72. MADRALAH V.T.,SHARMA R.K.,BALACHANDAR V.,REZVANI I.,  
COLLIP P.J.,CHEN S.Y. - J.Biol.Chem.  
248,4263,(1973).
73. CARDELL R.R. - Biochim.Biophys.Acta 148,539,(1967).
74. MELNISH A.H.,GREENBAUM A.L. - Biochem.J. 78,392,  
(1961).

75. NISHIMURA S., NOVELLI G.D. - *Biochim. Biophys. Acta* 80, 574, (1964).
76. MAHLER H.R., PERLMAN P.S. - *Biochemistry* 10, 2979, (1971).
77. ASHWELL M., WORK T.S. - *Annu. Rev. Biochem.* 39, 251, (1970).
78. SCHATZ G. - *Biochim. Biophys. Acta* 96, 342, (1965).
79. CRIDDLE R.S., SCHATZ G. - *BIOCHEMISTRY* 8, 322, (1969).
80. PALTAF F., SCHATZ G. - *Biochemistry* 8, 335, (1969).
81. PLATTNER H., SCHATZ G. - *Biochemistry* 8, 339, (1969).
82. PLATTNER H., SALPETER M.M., SALTZGABER J., SCHATZ G. - *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 66, 1252, (1970).
83. GROOT G.S.P., ROUSLIN W., SCHATZ G. - *J. Biol. Chem.* 247, 1735, (1972).
84. FUKUHARA H., KUJAWA C. - *Biochem. Biophys. Res. Commun* 41, 1002, (1970).
85. SCHATZ G. in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts" edit. by Racker E., Vol. 165, p. 251, American Chemical Society Monographs, Van Nostrand Reinhold, N.Y. (1970).
86. RUBIN M.S., TZAGOLOFF A. - *J. Biol. Chem.* 248, 4275, (1973).
87. RUBIN M.S., TZAGOLOFF A. - *J. Biol. Chem.* 248, 4269, (1973).



88. SEBALD W., WEISS H., JACKL G. - Eur.J.Biochem. 30, 413, (1972).
89. WEISS H., SEBALD W., BÜCHER T. - Eur.J.Biochem. 22, 19, (1971).
90. ANDERSON B.N., CIOTTI C.J., KAPLAN N.O. - J.Biol.Chem. 234, 1219, (1959).
91. SAKURAI T., HOSOYA H. - Biochim.Biophys.Acta 112, 459 (1966).
92. LORING H.S., FAIRLEY J.L., BORTNER H.W., SEAGRAN H.L. - J.Biol.Chem. 197, 809 (1952).
93. ACKERMANN W.W., POTTER V.R. - Proc.Soc.Exptl.Biol. Med. - 72, 1 (1949).
94. TZAGALOFF A., MEAGHER P. - J.Biol.Chem. 247, 594 (1972)
95. MASON Z., POYTON R.O. - Fed.Proc. 31, 1401 (1972)
96. KRAML J., MAHLER H.R. - Immunochemistry 4, 213 (1967).
97. LOEWY A.G., SIEKEVITZ P. in "Cell Structure and Function" Holt Rinehart and Winston, London, N.Y., Sydney, Toronto, p.314 (1972).
98. PALADE G.E. - Anat.Rec. 114, 427 (1952).
99. SJOSTRAND F.S. - Nature, 171, 30, (1953).
100. PALADE G.E. - J.Histochem.Cytochem. 1, 188 (1953).
102. FERNANDEZ-MORAN H. - Circulation 26, 1039 (1962).
103. RACKER E., TYLER D.D., ESTABROOK R.W., CONOVER T.E., PARSONS D.F., CHANCE B in "Oxidases and Related Redox Systems" (T.S. King, H.S.Mason, Morrison, ed) Vol.2 p.1077 Wiley, N.Y. (1965).

104. RACKER E, CHANCE B, PARSONS D.F. - Federation Proc. 23,431 (1964).
105. PENEVSKY H.S., WARNER R.C. - J.Biol.Chem. 240,4694, (1965).
106. PARSONS D.F. - Int.Rev.Exptl.Pathol. 4,1 (1965).
107. PARSONS D.F., WILLIAMS G.R. - Methods Enzymol. 10, 443 (1967).
108. HACKENBROOK C.R. - J.Cell.Biol. 30,269 (1966),
109. HACKENBROOK C.R. - J.Cell.Biol. 37,345 (1968).
110. HACKENBROOK C. R. - Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 61,598, (1968).
111. DEAMER D.W, UTSUMI K, RACKER L - Arch.Biochem. Biophys. 121,641 (1967).
112. PACKER L, WRIGGLESWORTH J.M, FORTES P.A.G, PRESSMAN B.C. - J.Cell.Biol. 39,382(1968).
113. HACKENBROOK C.R, KAPLAN A.I. - J.Cell.Biol. 42,221, (1969).
114. GREEN D.E, ASAI J, HARRIS R.A, PENNISTON J.T. - Arch. Biochem.Biophys. 125,648 (1968).
115. WEINBACH B.C, GARBUS J, SHEFFIELD H.G - Exp.Cell.Res. 46,129 (1967).
116. STONER C.D, SIRAK H.G - Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem. 349,1017 (1968).
117. PFAFF E, KLINGENBERG M, RITT E, VOGELL W. - Eur.J. Biochem. 5,222 (1968).
118. WEBER N.E, BLAIR P.V. - Biochem.Biophys.Res.Comm. 36,987 (1969).
119. WRIGGLESWORTH J.M, PACKER L. - Arch.Biochem.Bio-



120. phys.133,194 (1969).
120. MITTCHELL P. - Biol.Rev.Cambridge Phil.Soc. 41,445, (1966).
121. PACKER L.,UTSUMI K. - Arch.Biochem.Biophys. 131,386 (1969).
122. LEHNINGER A.L. - Physiol.Rev. 42,467,(1962).
123. SOTTACASA G.L.,KUYLENSTIERNA B.,ERNSTER L.,BERGSTRAND - J.Cell.Biol. 32,415,(1967).
124. PARSONS D.F.,WILLIAMS G.R.,CHANCE B. - Ann.N.Y.Acad. Sci. 137,643,(1966).
125. CHAPPELL J.B. - Brit.Med.Bull. 24,150,(1968).
126. RAW I. - J.Amer.Chem.Soc. 77,503,(1955).
127. COOPER C.,LEHNINGER A.L. - J.Biol.Chem. 219,489, (1956).
128. LÖW H.,VALLIN I. - Biochim.Biophys.Acta 69,361,(1963)
129. LEE C.,ERNSTER L. in "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" edited. Tager J.M.,Papa S.,Quagliariello, Slater E.C. - Biochim.Biophys. Acta Library 7,218,(1966),Elsevier Amsterdam.
130. Racker E. in "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts"(Racker E. ed.p.127, Van Nostrand-Reinhold N.Y.(1970).
131. Bachmann E. - Arch.Biochem.Biophys. 121,73,(1967).
132. FESSENDEN-RADEN J.M.,RACKER E. in "Structure and Function of Biological Membranes" edited by Rothfield L.I.,Acad. Press.N.Y.,London p.401,(1971).

Acad.Press London p.119 (1970).

655. VAN DAM K, MEYER A.J. - Ann.Rev. Biochem. 40, 115 (1971)
656. SLUSE F.E, RANSON M, LIEBECQ C. - Eur.J.Biochem. 25 207 (1972)
657. DE HAAN E.J, TAGER J.M, - Biochim.Biophys.Acta 153 98 (1968)
658. ROBINSON B.H, WILLIAMS G.R, HALPERIN M.L, LEZNOFF C.C. - Eur.J.Biochem. 20, 65 (1971)
659. PALMIERI F, QUAGLIARIELLO E, KLINGENBERG M. - Eur. J.Biochem. 29,408 (1972)
660. SLUSE F.E, GOFFART G, LIEBECQ C. - Eur.J.Biochem. 29, 408 (1972)
661. LEHNINGER A.L. - Biochemistry, Worth Publ.Inc. p.352 (1972).
662. HEMMERICH P., EHRENBERG A., WAHLER W.A., ERIKSSON SALACH J., BADER P., SINGER T.P. - FEBS Lett. 3,37,(1969).
663. SINGER T.P., SALACH J. - in "Methods in Enzymology Vol.18B, Acad.Press.New York p.416 (1971).
664. WALKER W.H., SINGER T.B. - J.Biol.Chem. 245,4224, (1970).
665. GHISLA S., HARTMANN U., HEMMERICH P. - Angew.Chemie Int.Ed.9,642,(1970).
666. KENNEY W.C., WALKER W., ZESZOTEK E., KEARNEY E.B., SINGER T.P. - Biochim.Biophys.Res.Comm. 41,488, (1970).
- 667, WALKER W.H., SINGER T.P. - Em.J.Biochim. 26,279,(1972)



703. OSAWA S., ALLFREY V.G., MIRSKY A.E - J.Gen.Physiol.  
40,491,(1957).
704. KONINGS A.W.T. - Biochim.Biophys.Acta 189,125,  
(1969).
705. CONOVER T.E. - Arch.Biochem.Biophys, 136,541,(1970)
706. CONOVER T.E. - Arch.Biochem.Biophys. 136,551,(1970)
707. BEREZNEY R., FUNK L.K., CRANE F.L. - Biochim.Biophys.  
Acta 223,61,(1970).
708. ZBARKY I.B. - Nature 221,257,(1969).
709. ARNOLD E.A., YOUNG D.E. - Exptl.Cell.Res. 52,1,  
(1968).
710. BEREZNEY R., FUNK L.K., CRANE F.L. - Biochim.Biophys  
Res.Comm. 38,93,(1970).
711. BEREZNEY R., FUNK L.K., CRANE F.L. - J.Cell.Biol.  
43,12a (1969).
712. KUZMINA S.V., ZBARKY I.B. - FEBS Lett. 5,34,(1969).



CUPRINS

	<u>Pag.</u>
Introducere	3
Date în legătură cu structura mitocondrială	7
- Structura și funcția membranelor mitocendriale.	32
- Localizarea unor enzime în mitecondriile de ficat de șobolan.	45
Transportul de electroni și procesul de fosforilare oxidativă.	50
- Reacții de oxide-reducere	51
- Enzime oxidoreducătoare participante în transferul de electroni	57
- Dehidrogenaze piridin nucleotid dependente.	58
- NADH dehidrogenaza lanțului respirator.	65
- Proteine cu fer neheminic din mitocondrie.	75
- Coenzima Q și transportul de electroni.	82
- Citocromii și lanțul respirator	96



- II -

	<u>Pag-</u>
- Citocromii b	107
- Citocromul $c_1$	112
- Citocromul c	115
- Citocromul a, Citocromul $a_3$	126
Citocrom oxidaza	
- Lanțul transportor de electroni mitochondrial.	147
- Izolarea lanțului transportor de electroni în formă de particule submitocondriale.	148
- Secvența componentelor din lanțul respirator	160
- Fosforilarea oxidativă	
- Fosforilarea oxidativă	172
- Ipoteza chemiosmotică	177
- Ipoteza conformațională	180
- Ipoteza "protonilor localizați"	182
- Agenți decuplanți ai procesului de fosforilare oxidativă	191
- Permiabilitatea membranei mitocondriale.	193
Transportul de ioni dependent de respirația mitocondrială.	



- III -

	Pag.
Efectul Pasteur și efectul Crabtree	202
Reglarea hormonală a respirației	204
Ciclul acizilor tricarboxilici	207
- Schema degradării finale a piruvatului în ciclul Krebs	209
- Dispoziția organizatorică intracelulară a respirației	211
- Etapa I	211
- Etapa II	211
- Etapa III	212
- Localizarea intracelulară a enzimelor ciclului Krebs	217
- Secvența reacțională în ciclul Krebs	218
- Citrat sintetaza	218
- Aconitaza (aconitat hidrataza sau citrat - izocitrat hidrelaza)	227
- Izocitrat dehidrogenaza NAD dependentă	232
- $\alpha$ -cetoglutarat oxidaza	235
- Succinat dehidrogenaza	241
- Fumaraza	247
- Malat dehidrogenaza	248
- Procesul de fosforilare oxidativă nucleară	252